

THÈSE  
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE  
(Diplôme d'Etat)

PAR

Paul LEPRON

né le 2 Février 1938 à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme)

Présentée et soutenue publiquement le 27 Avril 1966

Remarques sur  
l'Equipement Enzymatique  
des Plaquettes Sanguines  
Applications Physiologiques et Physio-Pathologiques

Président : M. DASTUGUE *Professeur*

Membres du Jury : M. BASTIDE *Professeur*

M. CLUZEL

M. PIGNIDE *Maîtres de Conférences Agrégés*



THÈSE  
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE  
(Diplôme d'Etat)

PAR

Paul LEPRON

né le 2 Février 1938 à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme)

Présentée et soutenue publiquement le 27 Avril 1966

Remarques sur  
l'Équipement Enzymatique  
des Plaquettes Sanguines  
Applications Physiologiques et Physio-Pathologiques

Président : M. DASTUGUE *Professeur*

Membres du Jury : M. BASTIDE *Professeur*

M. CLUZEL

*Maîtres de Conférences Agrégés*

M. PIGNIDE



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Doyen : G. MEYNIEL

Directeur Honoraire : M. MERLE

Assesseur : M. COULET

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET,  
MM. BUREAU, FOURNIER, GAUTHIER,  
et POMMÉ

*I. Professeurs titulaires :*

MM. BARRIER. — Clinique Chirurgicale A.  
BASTIDE. — Chimie Biologique et Pharmacodynamie.  
BAUDON. — Clinique Obstétricale.  
BERGERON. — Pathologie Médicale.  
COULET. — Botanique et Microbiologie.  
CUVELIER. — Hydrologie et Climatologie.  
DASTUGUE. — Biochimie médicale.  
DAUPHIN. — Chimie Pharmaceutique et Toxicologie.  
FEBVRE. — Pharmacie Galénique.  
GRAS. — Thérapeutique.  
JACQUEMET. — Technique chirurgicale.  
LATAIX. — Pathologie Chirurgicale.  
MEYNIEL. — Biophysique médicale.  
MOLINA. — Clinique Pncumo-phtisiologique.  
PETIT. — Médecine Légale et Médecine Sociale.  
POROT. — Clinique Neurologique et Psychiatrique.  
POURRAT. — Matière Médicale.  
ROUHER. — Clinique Ophtalmologique.  
TERRASSE. — Clinique Médicale B.  
THIEBLOT. — Physiologie.  
TRONCHE. — Pharmacie Chimique.  
TURCHINI. — Histologie et Embryologie.  
VAURS. — Bactériologie et Hygiène.  
WILLEMIN-CLOG. — Clinique Médicale Infantile.

*II. Professeurs à titre personnel :*

MM. THOMAS. — Oto-rhino-laryngologie.  
VIALLET. — Electro-Radiologie.

*III. Professeurs sans chaire :*

MM. BERGER. — Chimie Analytique.  
DUCHÈNE-MARULLAZ. — Physiologie.  
GERMAIN. — Clinique Chirurgicale B.

*IV. Maîtres de Conférences agrégés :*

MM. ALFIERI. — Physique Médicale.  
BOSSY. — Anatomie.  
Mlle CHATONIER. — Chimie Minérale et Minéralogie.  
MM. CLUZEL. — Bactériologie.  
DELAGE. — Anatomie pathologique.  
Mmes GAILLARD. — Physique Pharmaceutique.  
MOINADE. — Médecine Générale et Thérapeutique.  
MM. PIGNIDE. — Médecine Générale.  
VENRIES DE LAGUILLAUMIE. — Anatomie Pathologique.

*V. Agrégés :*

MM. CHAMPEIX. — Médecine Légale et Médecine du Travail.  
FOURIER. — Orthopédie.  
HOUDARD. — Chirurgie générale.  
JALLUT. — Médecine Générale.  
JANNY. — Neuro-Chirurgie.  
MENUT. — Pédiatrie et Puériculture.  
MERCIER. — Chirurgie Générale.  
Mlle RAMPON. — Médecine Générale.  
MM. RENARD. — Pneumo-phtisiologie.  
TOURNILHAC. — Neurologie et Psychiatrie.

Attaché Principal : M. BERTHON.

Bibliothécaire universitaire : M. ARCHIMBAUD.

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération en date du 6-6-1956).



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

*C'est à lui que je dois tout.*

A MA MÈRE

*En témoignage de mon affection.*

A MA FIANCÉE

*Présente dans mes peines et dans mes joies.*

A MON FRÈRE ET A MA BELLE-SŒUR

*Avec mon affection fraternelle.*

A MA GRAND-MÈRE

A MES NEVEUX

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS



A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur G. DASTUGUE

Professeur de Biochimie Médicale

Docteur ès Sciences

Lauréat de l'Académie de Médecine et de l'Académie des Sciences

Chevalier de la Légion d'Honneur

Commandeur de la Santé Publique

Officier des Palmes Académiques

*Il nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son laboratoire, après nous avoir dispensé ses leçons magistrales au cours de nos études. Son érudition et son esprit scientifique ont sans cesse orienté et suivi nos recherches, après en avoir inspiré le thème, avec M. le Professeur P. Bastide.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre fidèle attachement et de nos sentiments de très profonde reconnaissance.*



A NOTRE JURY DE THÈSE

Monsieur le Professeur P. BASTIDE

Professeur de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie  
Pharmacien des Hôpitaux

*En témoignage de respectueuse gratitude  
pour tous les conseils qu'il nous a prodigés  
et la part qu'il a prise dans la direction  
de ce travail.*

Monsieur le Professeur Agrégé R. CLUZEL

Maître de Conférences agrégé de Bactériologie

*Nous le remercions de l'honneur qu'il  
nous a fait en acceptant de juger notre  
travail.*

Monsieur le Professeur Agrégé L. PIGNIDE

Maître de Conférences agrégé (Médecine Générale et Thérapeutique)  
Médecin des Hôpitaux  
Chevalier des Palmes Académiques

*En témoignage de gratitude et nos respectueux hommages.*

A TOUS NOS PROFESSEURS DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE  
ET DE PHARMACIE DE CLERMONT-FERRAND

*En témoignage de reconnaissance et de  
respect.*

# *Introduction*

*La recherche dans le domaine enzymatique, qui ne date que du début de ce demi-siècle, a fait l'objet d'innombrables publications. Les modifications, souvent significatives du taux des enzymes ont montré leur intérêt en clinique humaine et permis de créer une véritable enzymosémiologie.*

*Sous cet angle, l'équipement enzymatique des plaquettes sanguines est d'actualité, ainsi le Professeur Dastugue, dans le laboratoire duquel le Docteur P.M. Plat a effectué toute une série de dosages enzymatiques sur ces éléments, a été chargé à plusieurs reprises de rapports sur ce problème, en particulier le 20 novembre 1964 à l'amphithéâtre Fernand Vidal, Hôpital Cochin, devant la Société de Biologie Clinique; le 22 novembre 1965, salle du Musée de l'Hôpital Saint-Louis, devant la Société d'Hématologie et celle de Transfusion sanguine, en collaboration avec le Professeur Pierre Bastide et le Docteur P.M. Plat. Il nous a demandé de reprendre une mise au point du problème en nous situant le plus possible sous l'angle des applications physiologiques et physio-pathologiques.*

*C'est ce que nous avons tenté de faire en s'appuyant essentiellement sur les travaux expérimentaux des Laboratoires de Biochimie Médicale et de Chimie Biologique et Pharmacodynamie de Clermont-Ferrand et sur l'importante documentation qui y a été réunie au cours de ces dernières années.*

*Notre mémoire sera divisé en cinq chapitres :*

*Le premier, de technique pure, consacré à l'obtention des préparations enzymatiques; le second au rapport précis existant entre les plaquettes et les activités enzymatiques décelées à leur niveau; le chapitre III à ces mêmes enzymes considérées comme agents du métabolisme plaquettaire; le chapitre IV envisage les rapports entre cet équipement enzymatique et les fonctions assurées par les plaquettes sanguines; le chapitre V étant enfin consacré aux variations enzymatiques plaquettaires à l'état pathologique notamment au cours de la thrombasthénie de Glanzmann.*

*Nous ne saurions terminer cette introduction sans remercier M. le Professeur Dastugue qui a inspiré ce mémoire et qui en a dirigé l'élaboration, ainsi que M. le Professeur P. Bastide et le Docteur P.M. Plat, qui nous ont autorisé à faire état de leurs travaux.*

---



# Conditions d'obtention des préparations enzymatiques

Nous étudierons successivement :

1. Le prélèvement sanguin.
2. L'isolement plaquettaire.
3. La numération des éléments.
4. Les techniques annexes.
5. Les préparations enzymatiques proprement dites.
6. L'expression des résultats.

### 1. *Le prélèvement sanguin.*

Généralement obtenu par ponction veineuse au pli du coude chez l'homme avec une aiguille de 18/10<sup>e</sup> de diamètre après anesthésie locale. Le sang est recueilli dans des flacons de 500 cm<sup>3</sup> contenant 100 cm<sup>3</sup> d'une solution anticoagulante dite « A.C.D. » suivant la formule :

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| — Citrate disodique . . . . .   | 1,66 g |
| — Glucose . . . . .             | 2,50 g |
| — Eau distillée, q.s.p. . . . . | 100 ml |

### 2. *L'isolement plaquettaire.*

De nombreuses méthodes de séparation des plaquettes ont été décrites, mais les plus intéressantes pour l'appréciation de leur activité enzymatique sont celles qui ne font intervenir que la différence de densité des divers constituants du sang (20, 28, 52, 61, 64, 92, 97, 111, 120, 121, 123, 125, 130, 136, 145, 149, 173). En effet, il est nécessaire d'utiliser le moins de substances étrangères possible : telles que des résines échangeuses d'ions ou des produits accélérant la sédimentation qui peuvent interférer sur les propriétés enzymatiques ou sur leurs effecteurs. Il apparaît que tous les procédés d'isolement par hémolyse sont à proscrire, car ils permettent la libération de ferments endo-globulaires qui perturbent la teneur enzymatique de l'air périplaquettaire.

Il est donc souhaitable de pratiquer des centrifugations successives, plus rapides et plus souples que la sédimentation spontanée (même chez des espèces comme le cheval où la vitesse est normalement élevée). Cette méthode demeure préférable même si l'on accélère artificiellement cette sédimen-

tation par addition de fibrinogène (Emerson), polyvinylpyrrolidone, dextran...

De nombreux auteurs (1, 14, 45, 50, 88, 120) ont imaginé des dispositifs de forme spéciale comportant une zone rétrécie au niveau de la couche leucocyto-plaquettaire pour faciliter la séparation de ces éléments figurés, tant est mince la couche des thrombocytes après sédimentation ou centrifugation.

C'est de la technique décrite par Maupin et Chary en 1952 (120) que découlent les différentes techniques utilisées actuellement. Celle-ci consiste, après réunion dans un flacon siliconé des tapis leucocyto-plaquettaires obtenus à partir du sang total, à séparer les divers éléments grâce à l'utilisation d'un système spécial composé ainsi : « une pipette à double courant est adaptée au col du flacon, ce qui permet d'introduire au fond du récipient une solution de glucose :  $d=1,200$ . Cette solution dense, agissant à la manière d'un piston liquide, chasse successivement vers le col de cygne de la pipette, dans l'ordre des densités croissantes, les quatre couches : a) plasma, b) plaquettes, c) globules blancs, d) globules rouges ».

On peut également réaliser en deux temps cette séparation des thrombocytes à partir du sang total recueilli sur la solution « ACD » (145) :

#### a) Obtention d'un plasma enrichi en thrombocytes.

Le sang est centrifugé pendant 10 minutes à 1.500 t/m (500 g.). Dans un appareil ordinaire, type H 6 Jouan immédiatement après la récolte ou après un bref séjour en chambre froide à  $+4^{\circ}$  C. On prélève aseptiquement le plasma surnageant enrichi en thrombocytes, sous une hotte à décantation équipée de lampes germicides à ultra-violets. On le transvase, en tenant compte des divers groupes sanguins érythrocytaires, dans d'autres récipients siliconés de 500 cm<sup>3</sup>. par pipetage sous pression d'azote, grâce à l'emploi d'une longue aiguille recouverte d'un manchon protecteur en caoutchouc. Cette technique permet de récupérer ultérieurement les culots globulaires pour leur utilisation en clinique humaine. On centrifuge une seconde fois ces flacons de plasma, issus de sang isogroupe afin d'éliminer le plus possible les érythrocytes et les leucocytes résiduels dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant enrichi en plaquettes est transvasé, toujours par pipetage sous pression d'azote, dans des tubes à centrifuger en matière plastique de 125 ml (International Lustroid Centrifuge Tubes).

#### b) Obtention d'une crème plaquettaire.

Les tubes remplis de plasma enrichi en thrombocytes sont

alors centrifugés pendant 45 mn à 2.400 tours minute (1.000 g.) dans un appareil frigorifique : modèle « International PR 2 ». Afin de recueillir le reliquat de thrombocytes qui pourrait être encore prélevé, on pratique sur le surnageant, un nouveau pipetage dans les mêmes conditions, donnant ainsi un plasma déplaquetisé dont l'activité diastasique pourra être évalué dans chaque cas. On place dans des tubes en matière plastique de 25 ml cette crème plaquettaire ainsi obtenue, en la mettant en suspension dans 10 à 20 ml de solution de chlorure de sodium isotonique contenant 1 % d'EDTA (sel disodique de l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique) ce qui permet d'éviter l'agglutination des thrombocytes. Tout en éliminant les érythrocytes et les leucocytes restant au fond du tube, une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 700 tours minute (75 g.) permet également de maintenir les plaquettes en suspension.

On place le surnageant dans des tubes de même capacité pour effectuer une centrifugation à 850 g. (2.400 t/m) pendant 45 mn pour obtenir de cette suspension plaquettaire dans du sérum physiologique à 1 % d'EDTA sodique une crème plaquettaire plus pure.

Après des centrifugations différentielles alternées, avec des décantations du liquide de lavage surnageant, les thrombocytes successivement en suspension dans le sérum salé isotonique contenant 1 % d'EDTA sodique, puis sous forme de crème onctueuse au fond du tube deviennent de plus en plus pures de toute trace d'hématies comme le montre la teinte rosée au début changeant au cours des traitements pour reprendre un ton blanc jaunâtre. La confirmation sera faite par contrôle microscopique.

On obtient ainsi après 3 à 5 lavages dans une solution chlorurée sodique isotonique additionnée d'EDTA une préparation plaquettaire contenant 40 à 50 millions d'éléments par  $\text{mm}^3$ , alors qu'il ne subsiste qu'un leucocyte pour 40.000 plaquettes et qu'aucun érythrocyte n'est découvert au microscope à contraste de phase.

La récolte et le traitement de 6 à 12 flacons de 400 ml de sang dans un centre de transfusion demande de 1 h 30 à 2 heures pour obtenir un plasma enrichi en thrombocytes, au laboratoire, les traitements demandent de 3 à 6 heures suivant l'importance des lavages. Ces différences de durée sont en fait fonction du degré de pureté désirée compte tenu de la capacité des appareils mis en service.

### c) Micro-méthodes.

Ces techniques d'isolement plaquettaires employées pour les petits animaux de laboratoire (Copley et coll., 1955-1956;

Aeberhardt, 1956) où elles sont indispensables étant donné la quantité de sang dont doit disposer l'expérimentateur, permettraient d'effectuer des dosages enzymatiques au niveau des thrombocytes à partir de prises de sang de volume limité, à intervalles réguliers au cours des thrombopathies humaines.

Les méthodes de Copley et Aeberhardt reprises par Truhaut et Clanet en 1962 nécessitent une très faible quantité de sang subissant comme précédemment, des centrifugations différentielles. Pour recueillir les divers constituants du sang, un dispositif spécial (tube d'Aeberhardt) présentant une zone rétrécie dans sa partie supérieure permet de sélectionner par leur densité décroissante les éléments du sang. Grâce à une pression exercée par du mercure qui joue en quelque sorte de rôle de piston.

### 3. Numération des éléments.

Deux types de méthodes sont généralement employées : Les unes dites « directes » où les plaquettes sont comptées après dilution du sang total. Les autres « indirectes » (Fonio, Pagniez-Mouton) établissent un pourcentage de plaquettes par rapport à un nombre de globules rouges et par une simple règle de trois permet de déterminer le nombre de thrombocytes.

Les liquides de dilution varient suivant les chercheurs. Piette (1959) utilise une solution hypotonique au chlorhydrate de procaine qui porte son nom et semble avoir l'avantage, que ce soit sur le liquide de Marcand où elle rend les thrombocytes plus nets du fait de leur légère turgescence ou alors sur la solution à la cocaïne de Feissly-Ludin (1949) évitant ainsi l'emploi d'un stupéfiant.

Après un repos d'une vingtaine de minutes, l'utilisation d'un hématimètre à rigoles rectilignes (type Thoma ou Burger) de faible profondeur (la moitié de celle de l'hématimètre de Malassez) permet une numération plus précise.

L'observation des plaquettes qui doivent être comptées systématiquement dans cinq grands carrés de la cellule de Thoma correspondant à  $2 \times 100$  de  $\text{mm}^3$  est très nettement facilitée par l'emploi d'un microscope à contraste de phase. En effet il suffit de totaliser le nombre d'éléments plaquettaires et de le ramener au  $\text{mm}^3$  en multipliant par 10.000 (dilution au 1/200<sup>e</sup>), pour connaître la richesse en thrombocytes de la « suspension mère ». Étant donnée la dilution choisie pour préparer cette dernière, il est possible de calculer le nombre d'éléments contenus dans la crème plaquettaire initiale.

D'autre part un contrôle de la richesse en plaquettes et le degré de pureté de la suspension considérée sont pratiqués

par une numération simultanée des trois variétés d'éléments figurés du sang suivant une technique décrite par Saracino (1951) (155).

#### 4. *Les techniques annexes.*

Elles comprennent la préparation du matériel indispensable.

##### a) *Nettoyage.*

Tous les flacons, pipettes, agitateurs... sont immergés pendant 24 heures environ dans un mélange sulfochromique, chauffé jusqu'à émission de vapeur à l'aide d'un bain de sable placé sous une hotte à aspiration continue.

Le matériel en plastique subit le même traitement, mais à froid. Le matériel en verre est séché à l'étuve, après un rinçage à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée. Les pièces en matière plastique sont placées au voisinage d'une source de chaleur de moyenne intensité afin que, en les laissant à proximité d'une fenêtre entr'ouverte, le degré d'humidité de la surface à hydrofuger permette ensuite au chlorosilane de se polymériser en un film continu par hydrolyse.

##### b) *Hydrofugation.*

On place pendant quelques secondes toutes les pièces en verre ou en plastique dans une solution de Rhodorsil (240 RP) à 20 % dans l'éther de pétrole, sous une hotte à aspiration continue, en raison du dégagement important en acide chlorhydrique. Ensuite on rince chaque pièce à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée très abondamment et enfin on laisse sécher.

#### 5. *Les préparations enzymatiques proprement dites.*

On dilue, en fonction de leur richesse en éléments figurés pour obtenir des préparations de concentration variant de 50.000 à 5.000.000 de thrombocytes par  $\text{mm}^3$  (pouvant atteindre 10 à 20 millions), selon l'activité enzymatique à apprécier, toutes les suspensions plaquettaires obtenues à partir d'une dizaine de flacons de 400 ml de sang recueilli sur 100 ml de solution « A.C.D. ». Pour les préparations destinées à être employées dans les 48 heures après l'isolement, il est nécessaire de les placer en chambre froide à  $+ 4^\circ \text{C}$ . Dans le cas contraire les suspensions plaquettaires seront conservées dans un congélateur à  $- 10^\circ \text{C}$  pour en apprécier à intervalle régulier l'activité enzymatique après décongélation; quelquefois même elles seront lyophilisées.

Le plasma déplaquettisé, obtenu comme il a été décrit

précédemment, est soumis systématiquement aux mêmes essais par certains auteurs (10, 11, 55, 145, 146) en guise de critère. En effet, des auteurs comme Zucker et Borrelli (1958) (194) estiment le lavage indispensable pour l'étude des enzymes existant en même temps dans les plaquettes et dans le plasma (transaminase GOT,  $\beta$ -glycérophosphatase, phosphatase acide...). Cependant si certaines activités enzymatiques persistent intégralement après le lavage (GOT par ex. d'après Gepner-Wozniewska et Caen, 1960) (78) d'autres disparaissent en tout ou partie : les ferments de la glycolyse (Lohr et Waller, 1959) (108) ; la glucose-6-phosphatase déshydrogénase (Wurzell et coll., 1961) (188) ; la 3 phosphoglycératekinase et la pyruvate kinase (Waller et coll., 1961). Il paraît donc préférable dans ce cas d'opérer sur des plaquettes séparées simplement du plasma et non lavées, en particulier pour la GPDH, le plasma déplaqueté étant inactif (Wurzel et coll., 1961) (188).

Pour la lactico-déshydrogénase et l'aldolase, Weinstein et coll., 1959) (186) ont montré que l'activité enzymatique des plaquettes fraîchement isolées et lavées était toujours inférieure à la différence P.R.P.-P.D.P. (plasma riche en plaquettes et plasma dépourvu de plaquettes), le problème est plus complexe car l'addition d'un plasma sans activité enzymatique serait capable de redonner aux plaquettes leur taux initial.

On peut se demander en effet si la dilution de la crème plaquettaire avec du sérum physiologique d'E.D.T.A. ou avec de l'eau distillée, est suffisante pour permettre la mise en évidence de toutes les activités enzymatiques des plaquettes.

Les congélations et décongélations successives ont été préconisées par certains auteurs.

Mais si plusieurs diastases supportent assez bien ce traitement (leucine amino-peptidase, transaminase TGO, aldolase, les ferments de la glycolyse (Chernyak et coll., 1960) (42) ; les déshydrogénases, Koppel et Olwin (1956) (104) et la phosphohexose-ismérase semblent être assez profondément altérées. Et si Herriot et coll. (1961) utilisent les ultra-sons pour mettre en évidence l'activité DNA-sique thromboocytaire, il convient certainement d'en user avec prudence étant donné leur action dénaturante bien connue.

## 6. Expression des résultats.

Comme le note Dreyfus et Schapira (1960) (63) aux « Récents progrès de la Sémiologie enzymatique » et Mlle Arvy dans un exposé jumelé « naissance de l'enzymopathologie » tout comme J.-E. Courtois en 1959 dans la même revue,

il apparaît indispensable de travailler dans des conditions standard de pH, de température de milieu tampon, de durée d'incubation, de concentration en substrat, etc.), de vérifier que les activités enzymatiques évaluées puissent être rapportées à des enzymes parfaitement définis, de faire appel enfin à des systèmes d'unités valablement comparables. Ce que l'on mesure en effet correspond presque toujours non pas à une concentration mais à une activité. Le temps n'est pas encore venu de pouvoir indiquer soit le poids de l'enzyme pour 100 ou 1.000 g d'échantillon analysé, soit la concentration en millième ou millionième de molécules par litre.

Il apparaît donc qu'une seule nomenclature pourrait permettre d'unifier les résultats et de permettre des comparaisons utiles; c'est celle qui exprimerait les activités en micromoles de substrat transformé par unité de temps, dans des conditions standard bien définies.

C'est ce mode d'expression qui a été adopté par les représentants de l'Ecole de Marburg. Les « Unités Bücher » correspondent au nombre  $\mu$  moles de substrat métabolisé à pH 7,5, après 1 heure d'incubation à 25° C pour  $10^{11}$  plaquettes. Là encore une difficulté supplémentaire apparaît suivant que les résultats seront rapportés soit au nombre des thrombocytes exprimés en valeur absolue ou par  $\text{mm}^3$ , soit au volume des éléments figurés (pour une comparaison plus adéquate, avec les érythrocytes et les globules blancs), soit au poids de plaquettes séchées ou fraîches, soit à la teneur en protéines de la préparation enzymatique...

C'est sans doute pour toutes ces raisons que beaucoup d'auteurs expriment encore le pourcentage de substrat en fonction de la richesse d'éléments figurés de la suspension, tout en mentionnant chaque fois :

— La nature, la concentration (nombre de plaquettes par  $\text{mm}^3$ , taux de dilution de la préparation mère ou du plasma) et éventuellement l'état (plaquettes « fraîches », congelées ou lyophilisées) de la préparation enzymatique :

— Le temps d'incubation au bain-marie.

— Le nombre d'expériences pour chaque série d'essais.

— La moyenne arithmétique  $M$  des résultats exprimés en pourcentage de substrat métabolisé dans les conditions d'expérimentation.

— L'écart standard «  $\sigma$  » pour chaque moyenne, caractérisant la dispersion des résultats, établi selon la formule :

$$\sigma = \frac{\Sigma d^2}{n - 1}$$

$\Sigma$  = Somme.

$d$  = Différence entre le résultat de chaque essai et la moyenne arithmétique M des résultats pour  $n$  expériences.

$n$  = Nombre d'expériences.

Telle est la façon de faire, qui a été retenue, tout au moins pour les travaux que nous rapportons.

---

# Enzymes et plaquettes

Nous étudierons dans ce chapitre les enzymes plaquettaires considérés « in situ », nous envisagerons successivement : leur individualisation par rapport aux autres éléments du sang, leur origine, leur localisation et enfin leur devenir tant au cours du vieillissement plaquettaire qu'à l'occasion de leur conservation :

### 1. *Individualisation.*

Certaines observations permettent de « situer » quelques-unes des activités enzymatiques plaquettaires par rapport à celles correspondantes des autres éléments du sang et autres sources de ferments.

#### a) Au sujet de l'intensité.

Pour la phosphatase (154) Salvidio estime son activité, compte tenu de la différence de volume cellulaire 0,78 fois supérieure à celle des leucocytes; ce qui fut confirmé notamment par Wagner et Yourke (179).

Pour l'activité phosphatasique alcaline, elle se situe à un taux 3,5 fois moindre que celui des leucocytes (Salvidio, 154). L'activité ATP asique des plaquettes estimée par Pedrazzini et Salvidio (142) serait 116 fois supérieure à celle des érythrocytes et plus de 3 fois supérieure à celle des leucocytes compte tenu encore de la différence des volumes cellulaires de chacun. Le pouvoir protéolytique des plaquettes tel qu'il ressort de l'hydrolyse de l'alanylglycine dans des conditions standard (notamment à 7,6 pour  $10^{10}$  thrombocytes à 37° C) est sensiblement équivalent à celui des érythrocytes et plus de 3 fois supérieur à celui des leucocytes, ceci avec les mêmes réserves (Salvidio (154), Salvidio et Parreira (153)).

D'après Bastide, Plat, Laporte et Dastugue (1963), une préparation contenant 1 million de plaquettes de cheval par  $\text{mm}^3$  permet l'hydrolyse de 42 % de L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide; une valeur équivalente est obtenue dans les mêmes conditions d'expérience, avec 2.500 globules blancs par  $\text{mm}^3$ , ou avec un hémolysat dilué, correspondant sensiblement à 200.000 globules rouges par  $\text{mm}^3$ . En d'autres termes, les thrombocytes, en ce qui concerne la leucine-aminopeptidase sont 5 fois moins actifs que les érythrocytes et 400 fois moins que les leucocytes, si l'on se réfère à chaque cellule. Cependant étant donné le faible volume des plaquettes par rapport à celui des autres éléments du sang, il semble qu'elles pos-

sèdent une activité leucine-aminopeptidasique assez importante.

Herriot et coll (1961) mettant en évidence dans le broyat de plaquettes une activité DNA-asiq dix fois plus forte que celle trouvée libre dans le sang, mais égale à celle du sérum, pensent que l'enzyme est libérée des plaquettes au cours de la coagulation. Vincent, Maupin et Marques-Vincent (1962) montrent que l'activité arginasique des plaquettes sanguines n'est appréciable qu'après addition de manganèse et que ce caractère rapproche l'arginase plaquettaire humaine de celle du sérum.

En 1960 Grignani et Löhr ont étudié les propriétés de l'hexokinase de différentes cellules sanguines et l'hexokinase de la levure. Gross en 1960 également a montré que la constante de Michaelis de ces hexokinases est du même ordre de grandeur, ce qui permet de penser qu'il s'agit d'un type enzymatique uniforme. L'hexokinase contenue dans les cellules pathologiques ne se différencie pas de celle contenue dans les cellules normales. Dans son ensemble l'étude des plaquettes montre une concentration dix fois plus importante en enzymes glycolytiques par poids frais que les érythrocytes; alors que plaquettes et leucocytes ne diffèrent que très peu dans leur échantillonnage enzymatique du métabolisme glucidique.

Madame Schapira en 1959 montre sur des homogénats de plaquettes correspondant à  $10^{10}$  éléments, que le pouvoir de scission du fructose 1-6 diphosphate s'élève à  $0,15 \mu\text{M}$  alors que contrairement aux leucocytes les plaquettes semblent ne posséder aucune activité I-phospho-fructo-aldolasique. Dale confirme la présence d'aldolase dans les thrombocytes. Les résultats de cet auteur permettent de comparer l'activité aldolasique des différents éléments du sang pour  $10^7$  cellules, exprimés en  $\mu$  mole de triosephosphate par ml de préparation, par heure, à  $50^\circ \text{C}$  et pH 7,2; érythrocytes :  $0,11 \mu$ ; leucocytes dans plasma :  $7,0 \mu$ ; thrombocytes dans plasma :  $0,15 \mu$ ; si l'on rapporte au poids de substance fraîche on a respectivement 120, 700, 1.800 unités par gramme.

Pour Tropeano et coll. (171) dans le sang humain l'activité transaminasique TGO se répartit ainsi : 80 % pour les globules rouges, 13 % aux plaquettes, 5 % aux globules blancs, 2 % pour le sérum. Waller, Löhr, Grignani et Gross ont précisé que  $10^{11}$  plaquettes avaient une activité transaminasique TGO 30 fois supérieure à celle de  $10 \text{ cm}^3$  de plasma. Gepner-Wozniowska et Caen ont confirmé les observations précédentes et trouvent dans une suspension de  $2 \cdot 10^8$  plaquettes, 75 % de l'activité du plasma (183, 78).

Gross (85), Löhr (109), Waller et coll. (181), revenant après Koppel et Olwin (102, 103) sur l'activité  $\alpha$ -glycérophosphate

déshydrogénasique des thrombocytes, montrent que, variant de 37 à 64 unités Bücher pour  $10^{11}$  éléments, elle se situe à un taux inférieur à celui des muscles lisses ou striés, mais supérieur à celui des érythrocytes. Zajicek et Datta en 1953 mirent l'accent sur la relation inverse qui semble exister entre les teneurs en acétylcholinestérase des érythrocytes d'un côté et des thrombocytes de l'autre : l'activité enzymatique des globules rouges diminue alors que celle des plaquettes sanguines augmente pour les espèces considérées et dans l'ordre suivant : homme, bœuf, cobaye, cheval, lapin, rat et chat. Il en est de même dans les travaux de Behrendt (12) et pour Mlle Arvy (3).

Pour Valette, Maupin et Huidobro (175), la quantité d'histamine détruite en  $\mu\text{g/ml/h}$  varie de 0,75 à 4,75 avec des préparations de plaquettes contenant de 250.000 à 50.000.000 éléments par  $\text{mm}^3$ ; alors que, dans des conditions semblables, ni les suspensions d'hématies ni celles de leucocytes ne présentaient de pouvoir de destruction enzymatique à l'égard de l'histamine.

Il est également très instructif de comparer le tableau donné par Waller et coll. de la distribution quantitative des enzymes plaquettaires, avec celle des autres tissus (181) (Löhr et Waller 1959 (108), Schmidt, 1960) (162).

#### b) Au sujet des facteurs pharmacodynamiques.

L'ion  $\text{Co}^{++}$  à une concentration de  $10^{-3}$  fait passer, dans les conditions de Kocholaty (101), la scission enzymatique de la glycyl-glycine par les plaquettes de 3 à 29 pour 100, mais par contre, diminue d'une façon notable les activités exopeptidasiques vis-à-vis de la glycyl-l-tyrosine, de la glycyl-l-alanine et de l-alanyl-glycine et de même en ce qui concerne le quotient respiratoire :

|                                    |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| Sang prélevé sur A.C.D.....        | Q.R. = 0,94 $\pm$ 0,08 |
| — Na-citrate .....                 | = 0,95                 |
| — $\text{Na}_2\text{-E.D.T.A.}$ .. | 1,0 $\pm$ 0,04         |
| — Na-oxalate .....                 | 0,97                   |

alors que la valeur normale, pour le même auteur, en présence de tampon phosphate ph 7 et de force ionique 0,15 M est de 0,94  $\pm$  0,08.

Maupin (1961) a montré que le marquage in vitro par le radiochromate de sodium ou même, l'or colloïdal radioactif, des plaquettes de l'homme ou du lapin, affecte peu, dans l'immédiat, leur activité respiratoire. La consommation d'oxygène est discrètement réduite par rapport à celle des témoins de même âge qui n'ont subi ni incubation ni centrifugation.

Sur un autre plan, l'influence effective de nombreux agents pharmacodynamiques sur les activités enzymatiques thrombocytaires posent des problèmes qui sont encore incomplètement résolus en ce qui concerne la composition des solutions destinées à recueillir ou à conserver les plaquettes en vue d'une transfusion ou d'une étude ultérieure.

D'après Fleisher (73) les ions  $Zn^{++}$  augmentent légèrement l'activité de la l-leucyl-glycinase plaquettaire. Par contre, d'après l'étude du même auteur, la leucyl-glycine-dipeptidase thrombocytaire, voit son pouvoir décroître par addition des ions  $Co^{++}$  ou de  $Mn^{++}$  dans les conditions où ils activent l'enzyme sérique homologue; ces études permettent de distinguer ces deux ferments, d'après leur origine.

L'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA) a également très peu d'effet sur la glycyl-glycyl-glycine-tripeptidase plaquettaire, de même que sur le ferment homologue des hématies, par contre, les glycyl-glycyl-glycine-tripeptidases leucocytaire et sérique sont très sensibles (chez l'homme) à l'EDTA et sont réactivées par les ions métalliques (Fleischer, 72). Le pourcentage d'hydrolyse de ce dernier ferment se trouve augmenté par les ions  $Co^{++}$  probablement parce que l'activité de cette tripeptidase se déroule en synergie avec celle de la glycyl-glycine-dipeptidase, favorablement sensible à la présence des ions métalliques.

Pour Datta et Zajicek (58), la pyrophosphatase thrombocytaire, comme celle des érythrocytes, n'agit pratiquement qu'en présence d'ions  $Mg^{++}$ , alors que le  $Co^{++}$ , le  $Cu^{+++}$  et l'alloxane exercent un effet inhibiteur. Les mêmes ions  $Mg^{++}$ , et à un moindre degré les ions  $Ca^{++}$ , augmentent l'activité de l'ATPase (Löhr, 1963). Koppel et Olwin (103) ont signalé en 1954 que l'adjonction, de cystéine ou de glutathion réduit, à des plaquettes intactes, fraîchement préparées exerçait un effet activateur vis-à-vis de leurs déshydrogénases.

Sous l'effet du monoiodoacétate, la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase plaquettaire peut décroître de 70 % de sa valeur normale (Waller et coll., 181) tandis qu'il se produit une diminution de l'ATP avec une augmentation équivalente de l'ADP et que le thromboélastogramme voit son amplitude maximale se réduire en même temps que la rétraction du caillot se trouve inhibée.

Campbell et coll. (39) ont étudié l'influence des anti-coagulants sur le système oxydasique :

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| A.C.D. . . . . .     | 12,1 $\pm$ 3,5 |
| Na-citrate . . . . . | 4,95 $\pm$ 1,8 |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Na <sub>2</sub> -E.D.T.A. .... | 8,9 ± 2,9 |
| Na-oxalate ....                | 4,6 ± 0,9 |

(Pour une valeur normale de 9,6 à 14,9 mm<sup>3</sup> ou µl par milliard de plaquettes et par heure.)

## 2. Origine.

De nombreux auteurs ont étudié dans un certain nombre de cas particuliers l'origine des enzymes que leurs activités biologiques ont permis de mettre en évidence au niveau des plaquettes sanguines. C'est ainsi qu'une étude sur l'histogénèse des thrombocytes permettait à Zajicek (1954-1956) (190-191) d'établir un parallèle, chez l'homme, le cobaye, le lapin et le chat, entre l'activité acétylcholinestérasique des mégacaryocytes et celle des plaquettes.

La présence dans la moelle du chat de petites cellules, renfermant de l'acétylcholinestérase alors que le protoplasme endothélial érythropoïétique et granulopoïétique à ce niveau, ne manifeste pas ce pouvoir estérasique, incitait même ce chercheur à évoquer les premiers stades de la mégacaryocyto-génèse.

Rogister et Gerestzoff en 1958 confirmèrent la présence d'acétylcholinestérase au niveau des hématies, des plaquettes, et des mégacaryocytes de quelques espèces animales ainsi que son absence dans les leucocytes des mêmes espèces et leurs précurseurs. La présence de cette estérase a été montrée par ces auteurs non seulement dans le cytoplasme des mégacaryocytes mais encore dans les promégacaryocytes (mégacaryocytes basophiles) et à concentration plus faible dans les mégacaryoblastes, par une étude plus poussée, quant à la recherche de cette activité enzymatique au niveau des principales cellules de la lignée mégacaryocytaire, chez la souris notamment.

On peut donc penser, malgré quelques différences individuelles, que l'activité acétylcholinestérasique croît au cours de la maturation des cellules de la lignée mégacaryocytaire, atteignant son maximum dans le mégacaryocyte jeune pour décroître ensuite légèrement et se retrouver dans les plaquettes sanguines sous une répartition assez uniforme que les auteurs estiment difficilement précisable par suite des difficultés techniques. Mais du point de vue envisagé ici, l'ensemble de ces observations montre bien la présence permanente de l'acétylcholinestérase dans les plaquettes sanguines depuis leurs formes les plus primitives.

Rabinovitch et Andreucci en 1949 par les techniques cytochimiques avaient mis en évidence dans le noyau et le cytoplasme des mégacaryocytes, les phosphatases acide et alcaline.

C'est dans le cytoplasme que la phosphatase acide était la plus abondante.

Chevillard (45) dès 1945 dans les plaquettes du lapin et après lui Mizuno et coll. (131) dans celles du bœuf et de nombreux auteurs dans les plaquettes humaines, avaient identifié une phosphatase acide. Ces observations fournissent des arguments supplémentaires, s'il en est besoin, en faveur de l'origine mégacaryocytaire des plaquettes et de certains de leurs enzymes. Mais il est bien évident qu'il n'en est pas toujours ainsi. En effet, les plaquettes peuvent capter un certain nombre de substances présentes dans le plasma. Ce fait a été particulièrement étudié dans le cas de la sérotonine et rapporté dans les revues générales de Zucker (1959) (195) et de Maupin (1960) (127).

Nous indiquerons simplement ici que ce phénomène est certainement beaucoup plus général, puisque par exemple en ce qui concerne le facteur I décrit par Ware et Seegers (185) les travaux d'Owren et Rappaport ont montré qu'il s'agissait d'un facteur plasmatique adsorbé à la surface des plaquettes (facteur V). Il en va certainement de même pour bien d'autres diastases.

Les recherches de Valette, Maupin et Huidobro (1957) (176) montrent que si l'élévation du pouvoir histaminasique sanguin au cours de la grossesse, est imputable pour la plus grande part au plasma (environ les 2/3) il n'empêche que l'histaminase plaquettaire subit aussi une très nette augmentation, qui est due à l'élaboration par le placenta de cet enzyme. On peut alors se poser la question de savoir si une partie de cette histaminase placentaire ne serait pas fixée ultérieurement par les plaquettes sanguines. Il en est de même à l'état normal pour l'histaminase déversée dans le sang par la lymphe provenant des différents organes et en particulier du rein.

Gepner-Wozniowska et Caen (78) en 1960 confirmèrent la présence de transaminase glutamo-oxaloacétique au niveau des thrombocytes, mais montrèrent que cette activité est pratiquement nulle dans les eaux de lavage des plaquettes (Magalini et Stefanini (117) (1956) et qu'il n'existe aucun parallélisme entre les variations de la GOT plasmatique et de la GOT plaquettaire. Ces éléments, sans apporter une décision, permettent de penser que la GOT est réellement renfermée dans les plaquettes, c'est-à-dire qu'elle n'a pas été simplement adsorbée par celles-ci aux dépens du plasma, autrement dit qu'elle correspond à un constituant « intime » suivant l'expression de Magalini et Stefanini.

### 3. Localisation.

La structure des plaquettes telle qu'elle nous a été révélée

par les auteurs (Feissly et coll. 1957) (70), Rodman et coll. 1963 (151) au moyen du microscope électronique, est très complexe et il n'entre pas dans cet exposé de nous y aventurer.

Nous mentionnerons seulement :

a) « Un site » profond localisé à l'intérieur des granules de divers types (alpha, bêta, gamma, delta, granulomètres), en particulier les mitochondries qui jouent un rôle des plus importants.

b) « Un site diffus » ou vacuolaire désigné par certains sous le nom de hyalomère.

c) Enfin « l'atmosphère plasmatique périplaquettaire » que les lavages ont tant de peine à franchir.

Pour Iglauer et Weber 1931 (95) la catalase se situerait dans les granules, de même que la déshydrogénase- $\beta$ -hydroxybutyrique (Baloch et Cohen 1961 (9) alors que pour Smith, Robinson et Tyson (166) les granulations azurophiles des mégacaryocytes des plaquettes sanguines donnent une réaction histochimique négative, en ce qui concerne les oxydases.

Les ferments du cycle citrique se situent au niveau des mitochondries. Pour Chernyak et Guseinov 1961 (43), les mitochondries isolées à partir des plaquettes humaines respirent sans utilisation de phosphore : l'addition d'hexokinase entraîne une élévation de la seule consommation d'oxygène, à l'opposé donc des mitochondries du foie qui sont le siège d'une phosphorylation oxydative importante.

Quant à l'ATPase, elle se situe obligatoirement dans un site distinct de celui de l'ATP puisque, comme nous le verrons plus loin, son hydrolyse avec la libération de l'énergie qui s'ensuit, ne saurait avoir lieu avant la métamorphose visqueuse (Gross 1960) (84-87).

Nous pouvons encore dire, dans le même sens, qu'un certain nombre d'enzymes plaquettaires tels que la pyrophosphatase (Datta et Zajicek (57) ou la phosphatase acide Löscher (114) sont rapidement libérées lors de la lyse des plaquettes alors que la déshydrogénase lactique ne l'est pas (Zucker et Borrelli, 1958) (193). Cette fuite enzymatique peut donc être considérée suivant l'avis respectif des auteurs précédents, comme test de thrombocytolyse ou de détermination d'une fragilité particulière des plaquettes.

Magalini et Stefanini (117) en ce qui concerne la transaminase glutamo-oxalo-acétique; Autustinsson et coll. (4) en ce qui concerne la cholinestérase vraie; Zucker et Borrelli (193-196) pour ce qui est de la  $\beta$ -glycéro-phosphatase, de la phosphatase acide, de la lacticodéshydrogénase; Dohrmann et Klesper estiment que la richesse des thrombocytes en ces ferments est

suffisante dans un certain nombre d'espèces pour que les plaquettes soient considérées comme la source possible de ces enzymes dans le plasma et pour rendre compte au moins en partie de l'activité enzymatique correspondante du sérum. Il convient donc avant d'attribuer à un enzyme sérique, une origine tissulaire déterminée, par exemple la prostate pour la phosphatase acide, de s'assurer que les plaquettes sont mises hors de cause.

Avec les eaux de lavage disparaissent les ferments solubles de la glycolyse (Löhr et Waller, 1959) (108), alors que la transaminase glutamo-oxaloacétique n'y apparaît pas (Gepner-Wozniowska et Caen, 1960) (78). Il en est de même pour la respiration proprement dite où les lavages n'exercent pas une influence majeure : Bettex et Luscher (1960) (16), ont trouvé une consommation de 10,9  $\mu$ l d'oxygène par heure et par milliard de plaquettes non lavées et dans des conditions comparables, 12,4  $\mu$ l pour les plaquettes lavées. Zucker et Borrelli 1958 (193) estiment au contraire que le lavage des plaquettes détruit la consommation d'oxygène. Mais ils estiment que le lavage est indispensable pour l'étude des enzymes existant simultanément dans le plasma et dans les plaquettes.

Une notion importante à ce sujet, développée successivement par Bigelow 1954 (19), Bounameaux 1957 (27), Saligmann et coll. 1957 et autres, est celle « d'atmosphère périplaquettaire ».

La plupart des facteurs plasmatiques de la coagulation ont été retrouvés dans cette atmosphère périplaquettaire, en particulier les facteurs antihémophiliques A. R. et le facteur Hageman (Caen et Hass 1960) (34), tandis que le facteur thromboplastique est présent dans les chromomères (Fonio 1948) (74).

#### 4. *Devenir.*

Nous envisagerons successivement le devenir des enzymes plaquettaires au cours du vieillissement des thrombocytes et au cours de leur conservation.

##### a) *Vieillessement plaquettaire.*

Une étude particulière aux caractéristiques morphologiques et biologiques du vieillissement plaquettaire a été faite en 1962 par Detwiller et coll. (60). Les plaquettes sanguines subissent un vieillissement réel, c'est-à-dire, qu'elles ne disparaissent de la circulation par le seul hasard de leur utilisation pour l'hémostase. Le nombre des plaquettes marquées diminue progressivement avec le temps, ce qui ne saurait être expliqué par le seul fait de leur utilisation. Nous n'étudierons pas dans ce paragraphe les problèmes pourtant sou-

vent parallèles de la conservation des plaquettes et leur lyse éventuelle « *in vitro* ».

Detwiler et coll. (60) ont pris comme tests pour ce vieillissement des plaquettes, l'aspect morphologique, l'activité sur la rétraction et la richesse en ATP. L'isolement des plaquettes de rats était fait après collection du sang sur EDTA, et sédimentation fractionnée sur dextran. L'obtention de plaquettes jeunes était réalisée de la même manière sur du sang prélevé 48 heures après injection au rat de sérum antiplaquettes. Pour les plaquettes vieilles on irradiait à 900 *r in toto*; les rats étaient saignés 6 jours après l'irradiation.

Les résultats obtenus montrent quelques différences :

1°) Les plaquettes lavées étaient d'autant plus petites qu'elles étaient plus vieilles (pour 1 ml, 8,8  $10^{10}$  éléments pour les jeunes; 10,6  $10^{10}$  éléments par ml pour les normales et 11,8  $10^{10}$  pour les vieilles).

2°) La teneur en ATP ne varie guère en fonction de l'âge cellulaire (4,23 micro-mole/  $10^{11}$  plaquettes jeunes; 4,15 pour  $10^{11}$  plaquettes normales et 3,60 pour  $10^{11}$  plaquettes vieilles).

3°) Il existe cependant une différence fonctionnelle statistiquement significative pour la rétraction du caillot avec les plaquettes jeunes, normales ou vieilles.

L'âge différent des plaquettes permettrait de séparer par des artifices physiologiques les éléments entre eux. Mais il paraît important surtout de constater la constance relative du taux d'ATP dans les plaquettes alors que son taux diminue dans les mêmes circonstances au niveau des hématies. Ceci nous laisse à penser que le mécanisme critique dans la sénescence des plaquettes n'est pas le même que dans celui des hématies. La rétraction du caillot qui demande de l'énergie serait sous la dépendance soit du taux d'ATP immédiatement disponible, soit de la glycolyse dont l'inhibition ferait décroître la rétraction d'environ 20 % (à taux constant de plaquettes). La diminution dans la capacité des plaquettes à utiliser le glucose assez rapidement pour produire l'ATP additionnel nécessaire expliquerait la réduction dans la capacité des vieilles plaquettes à faire rétracter le caillot.

Löhr (260) avait déjà signalé dans le même sens, un abaissement significatif de la glycéro-aldéhyde-3-phospho-déshydrogénase au cours du vieillissement plaquettaire.

#### b) Conservation plaquettaire.

Les plaquettes sanguines sont des éléments fragiles de conservation difficile. Ce sont des organites anucléés qui vieillissent très vite. On a déjà signalé depuis longtemps leur altération au contact du verre et de l'air et leur survie précaire

dans le sang citraté. Maupin (1959) (126) dans un article consacré à la transfusion des plaquettes sanguines et ses critères d'efficacité a montré l'importance pratique du problème: « La première qualité de la transfusion des plaquettes sera d'apporter sous une forme viable les éléments figurés de l'hémostase ». Cet élément capital qui ressort de cet exposé met le point sur le fond même du problème en négligeant la question du devenir *in vivo* des plaquettes transfusées dont la demi-vie, d'après Marmont (1958), dans les conditions idéales serait de 50 à 60 heures (118). Nous laissons de côté également les incidences soulevées par la présence d'auto- et iso-anticorps plaquettaires, l'existence éventuelle de groupes plaquettaires autonomes et autres discussions d'ordre immunologique, les indications des transfusions plaquettaires, les critères de leur efficacité qui ne sont que des problèmes annexes.

Ainsi se trouve délimité, dès le point de départ, ce qui revient au simple apport d'un facteur de coagulation (facteur thromboplastique plaquettaire, ou facteur 3) qui, préformé dans les plaquettes, peut y être détecté après un temps de conservation prolongé, Gross 1959 (83) et ce qui revient à des plaquettes viables, c'est-à-dire l'arrêt d'une hémorragie chez un malade thrombopénique, Maupin 1959 (126).

Jusqu'à présent, aucune préparation de plaquettes, les mettant à l'abri d'une atteinte quelconque de leur intégrité ou de leur vitalité, n'a pu être utilisée de façon efficace, comme substitut d'une suspension de plaquettes fraîches et métaboliquement actives.

Jackson et coll. (96), Hjort et coll. 1959 (91), Firkis et coll. en 1960 ont bien insisté sur ce point.

D'après Raccuglia et Bethell 1960 (148) un effet optimal n'est obtenu qu'avec des plaquettes conservées moins de 24 heures. C'est ce que confirment également les expériences de Baldini et coll. 1960 (7): si l'on considère la viabilité des plaquettes marquées au Cr 51 on voit qu'elle diminue de façon très rapide dans les 20 premières heures pour devenir pratiquement nulle après 24 heures. Zucker et Borrelli en 1958 (193-196) rappellent que du point de vue morphologique les plaquettes dans le sang circulant ont la forme de disques plats ressemblant plus ou moins à des pièces de monnaie. Cet aspect, disent les auteurs, dépendrait du milieu ionique, de la présence de macromolécules, de la température mais aussi d'un métabolisme intraplaquettaire normal. La forme discoïde demeure pendant 1 heure si le sang est prélevé sur oxalate ou citrate à 37° C. Les plaquettes deviennent sphériques avec généralement des pseudopodes si le sang est refroidi. Si l'on réchauffe alors le sang, la majorité des plaquettes reprennent la forme discoïde.

Gross (83) en 1959 a montré que du point de vue bio-

chimique les plaquettes conservées seulement 24 heures dans du sang citraté avaient déjà perdu une grande partie de leur ATP (différence significative avec ce que nous avons eu à signaler pour le vieillissement proprement dit) et une grande partie de leur activité enzymatique. Parallèlement, le pouvoir rétractif de ces plaquettes est diminué de 30 % alors que comme nous le disions plus haut, la conservation du facteur lipodique ou encore du facteur 4, paraît excellente dans presque tous les cas et Gross (1960) (85) n'a pu mettre en évidence de ce point de vue, des différences appréciables qu'il s'agisse de plaquettes « survivantes » (Gross 1957) (85) ou de plaquettes lyophilisées (Gross 1959) (83).

Il faut donc bien comprendre, avec Lüscher 1959 (114) mettant à part le facteur lipodique préformé et relativement stable, que la fragilité plaquettaire est liée en grande partie aux propriétés de la membrane. Celle-ci ne maintient des gradients de concentration entre les éléments du milieu ambiant et ceux du milieu intérieur, que dans la mesure où de l'énergie lui est fournie par le métabolisme thrombocytaire. La dépression des systèmes enzymatiques conduit à un défaut de perméabilité puis, à l'extrême, à la destruction de la membrane et à la lyse cellulaire.

De toutes ces modifications constatées l'essentiel serait donc de connaître de façon précise l'équipement enzymatique et le métabolisme des plaquettes pour conserver à celles-ci l'intégrité de leur biochimisme. Il n'a été jusqu'à présent pas possible d'intervenir d'une façon totale et les seules tentatives ne sont que fragmentaires ou empiriques et font appel à des substances chimiques ou à des procédés physiques ou physico-chimiques.

#### 1°) Les procédés chimiques.

C'est Ollgaard qui en 1951 (140) a le premier signalé que le glucose exerce une action protectrice sur la survie des plaquettes. Bien d'autres auteurs après lui (Gross 1958) (81); Baldini 1960 (8) ont tenté de conserver les plaquettes dans des milieux destinés à préserver leur vitalité : glucose, tampons phosphate, inosine, adénine, etc.

De nombreux auteurs ont constaté que les substances thioloprives avaient une influence dépressive *in vitro* sur la rétraction du caillot, la métamorphose visqueuse et la survie des plaquettes (Ollgaard 1951) (140), Fantl et coll. 1951 (67), Koppel et coll. 1956 (104), Zucker et Borelli 1959 (197), Braustein et coll. 1960 (30). De même Koppel et Olwin en 1954 (102), Szirmai et Bajusz en 1955 (170), Bounameaux 1957 (27), Gross 1960 (84) ont montré que les substances thiolo-protectrices : cystéine, glutathion réduit, ont un effet protecteur et même activateur sur ces fonctions plaquettaires.

Ce qui a fait conseiller à Gross et coll. 1961 (85) l'adjonction de glutathion dans les milieux destinés à la conservation des plaquettes. Rappelons avec ces auteurs que le glutathion doit être considéré comme le coenzyme ou plus vraisemblablement comme le site actif de la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase, diastase clé du biochimisme plaquettaire, comme nous le verrons plus loin.

Il est bien évident que l'on devra s'abstenir d'employer des substances inhibitrices vis-à-vis de ces mêmes ferments, l'iodiacétate par rapport à la glycéraldéhyde-déshydrogénase par exemple. Si prise sous cet angle, cette observation paraît évidente elle l'est beaucoup moins lorsqu'on fait appel aux anticoagulants qui affectent différemment la consommation des plaquettes en oxygène d'après Campbell 1956 (36) ainsi que leur morphologie d'après Zucker et Borelli 1959 (196) et qui restent sans grande importance pour les autres (Tullis 1953) (174).

Il nous faut déplorer cependant d'avoir recours à un composé anticoagulant et antiagglutinant tel que l'EDTA, dont les propriétés chélatrices en font un intercepteur d'ions important, étant donné la nature métalloprotéique de certains enzymes plaquettaires et la réactivation de plusieurs d'entre eux pour les ions métalliques. Il en est ainsi de certaines peptidases qui ont leur pouvoir accru en présence d'ions  $\text{Co}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  et manifestent une sensibilité particulière à l'EDTA (Kocholaty 1960) (101). L'utilisation d'une solution physiologique saline contenant 1 % d'EDTA afin d'obtenir des plaquettes bien individualisées par la technique employée par Dastugue et coll. (56) nous incite à évoquer l'incidence possible de ce chélateur sur les activités enzymatiques dosées.

Il est nécessaire pour maintenir la forme du disque d'avoir une concentration minimale de  $\text{Mg}^{++}$ ; si l'EDTA (sodique) est utilisé comme anticoagulant à une concentration suffisante, tout le  $\text{Mg}^{++}$  est alors chélaté, les plaquettes sont pour la plupart sphériques. Si l'on utilise alors moins d'EDTA sodique ou si l'on emploie de l'EDTA magnésien ou si un très léger excès de  $\text{Mg}^{++}$  est ajouté au sang prélevé avec la concentration habituelle de EDTA sodique, la plupart des plaquettes ont une forme discoïde (Zucker et Borelli 1958) (194). Pour les mêmes auteurs il semble que les colloïdes jouent un rôle dans le maintien de la forme du disque, en effet les plaquettes prélevées en milieu salin sont sphériques même si elles sont conservées à 37° C., mais l'adjonction d'albumine ou de gomme acacia ramène la plupart d'entre elles à leur forme primitive.

Nous citerons encore le recours à la gélatine préconisé par Tullis en 1952 (173).

La controverse existe encore en ce qui concerne les lava-

ges, pour Bettex-Galland et Luscher 1961 (17) ils ne modifieraient que fort peu la consommation d'oxygène, alors que pour Stefanini et Dameshek 1955 (168) ils aboliraient cette consommation détruisant ainsi la capacité de survie des plaquettes après transfusion.

Par contre « une question qui ne paraît pas devoir être remise en cause est celle de l'action des surfaces sur la viabilité des plaquettes : nous gardant sur ce point d'une opinion trop optimiste, nous considérons l'emploi des silicones et autres hydrofugeants, des élastomères de silicone ou des matières plastiques non mouillables comme indispensable à toute manipulation de ces éléments », Maupin 1959 (126).

## 2°) Les procédés physiques et physico-chimiques.

### a) Plaquettes conservées à $+ 4^{\circ}$ C.

La conservation à  $+ 4^{\circ}$  s'avère insuffisante et une disparition progressive des activités respiratoire et glycolytique est mise en évidence par la plupart des auteurs. Il en est ainsi de l'activité oxydasique qui disparaît très rapidement des plaquettes conservées à  $+ 4^{\circ}$  C, que ce soit à l'état isolé ou dans le sang total rendu incoagulable en présence d'ACD ou d'EDTA (Campbell 1956) (35-36). Pour Chernyak et coll. 1960 (41) les plaquettes maintenues dans des conditions stériles à  $+ 4^{\circ}$  C verraient diminuer qu'assez progressivement leur activité respiratoire ainsi que leur aptitude à accumuler l'acide lactique.

Pour Löhr et coll. 1959 (108) l'activité glycolytique diminue d'environ 50 % en une quinzaine de jours. Quant à la déshydrogénase malique et à la TPNH-oxydase, il n'en reste que des traces. L'ATP est tombé à près de 4 % de sa valeur initiale, l'ADP à 24 % alors que la concentration en AMP est quatre fois plus élevée qu'à l'origine et la synthèse des nucléotides est interrompue alors que par ailleurs, la consommation d'oxygène est à peine modifiée.

Seegers 1956 (164) sur un plan un peu différent montre que le facteur plaquettaire I reste stable pendant très longtemps sur des plaquettes conservées dans la glacière. Pour ce même auteur l'activité du facteur plaquettaire, ou facteur 4, n'est guère altérée par une conservation d'une durée de 6 jours à  $+ 4^{\circ}$  C mais celle-ci est extrêmement réduite au 14<sup>e</sup> jour. Les plaquettes perdent en quelques jours à la température de  $4^{\circ}$  leur propriété normale de capter à température physiologique la sérotonine plasmatique contre un gradient de concentration, pour Weissbach et Redfeld 1961 (187).

L'adjonction de gélatine signalée par Tullis (173) combinée avec la réfrigération peut permettre le maintien pro-

longé du nombre des plaquettes. Mais pour Maupin 1959 (126) elles ne survivent pas après transfusion.

Avec Cohen et Gardier 1962 (48-49) travaillant sur des plaquettes de chien, on peut donc affirmer que la conservation plaquettaire ne peut être assurée de façon satisfaisante à la température de  $+ 4^{\circ}$  C même après l'adjonction de nucléosides ou autres substances jugées protectrices qui sont inactives à cette température.

#### b) Plaquettes congelées.

Chernyak et coll. 1960 (42) ont montré que les alternatives de congélation et de décongélation peuvent réduire l'activité enzymatique plaquettaire de la respiration et de la glycolyse.

Pour Koppel et Olwin 1956 (104) l'activité des déshydrogénases thrombocytaires semble être étroitement liée à l'intégrité morphologique des plaquettes.

Ainsi l'activité de la succino-déshydrogénase diminue rapidement et proportionnellement à la lyse thrombocytaire après congélations et décongelations répétées. Ce phénomène est à mettre en parallèle avec les observations de Dastugue 1961 (129) en ce qui concerne la baisse du pouvoir de la phosphohexose isomérase relevée au niveau des plaquettes sanguines maintenues plusieurs jours dans un bloc frigorifique à  $- 10^{\circ}$ . Ce même auteur a remarqué que dans les mêmes conditions au bout de 3 semaines, la leucine-amino-peptidase, la transaminase TGO et l'aldolase avaient conservé la majeure partie de leur pouvoir enzymatique.

#### c) Plaquettes lyophilisées.

Pour Babini et coll. 1960 (5), Cacciari et Babini 1960 (87), la lyophilisation n'altérerait que d'une façon peu appréciable les activités GOT, GPT et aldolasique, et ne modifierait pas les données de la numération. Il est cependant probable qu'elle ne respecte pas les enzymes essentiels de la glycolyse car pour Maupin 1959 (126) les plaquettes lyophilisées sont dépourvues des propriétés dynamiques qui sont le propre des plaquettes fraîchement préparées.

Maupin en 1959 (126) suggérerait le recours à la congélation en milieu glycérolé. En effet, le pouvoir protecteur du glycérol vis-à-vis des tissus vivants est considéré comme l'une des plus grandes découvertes de la biologie contemporaine. On peut admettre que l'ensemble des phénomènes de cristallisation se trouve ralenti en présence de glycérol et que l'apparition brusque de glace est transformée en une propagation uniforme de microcristaux. De plus la présence de glycérol

entre ces microcristaux abaisse l'hypertonie engendrée par la congélation même et diminue les variations osmotiques. Enfin elle fait passer une partie de l'eau libre intracellulaire à l'état d'eau liée et engendre une structure vitreuse amorphe. De toute manière son pouvoir protecteur est total vis-à-vis d'éléments au niveau desquels il est facile de l'apprécier ultérieurement comme c'est le cas pour les spermatozoïdes, on peut donc envisager qu'il en est de même pour les thrombocytes.

Cohen et Gardner en 1959 et 1960 (46-47) ont étudié cette méthode sur les plaquettes et il ne semble pas qu'elle ait donné des conclusions généralisables en clinique humaine.

C'est dans ce sens, que le dernier point, qui retiendra notre attention, sera celui des tests à mettre en œuvre *in vitro* pour se rendre compte de l'efficacité des techniques de conservation. Hartmann et Conley en 1953 (92) préconisèrent comme test de leur viabilité, l'appréciation du pouvoir des plaquettes vis-à-vis de la rétraction du caillot.

Morita et Asada (1958) (134-135) proposaient d'utiliser comme témoin de la lyse des plaquettes dans leur milieu de conservation, le passage en solution de phosphatases. Luscher 1959 (115) insiste sur le fait que la fragilité des plaquettes sanguines est liée en partie aux propriétés de la membrane. Celle-ci ne peut maintenir des gradients de concentration entre le milieu extérieur et le milieu intérieur que dans la mesure où la quantité d'énergie fournie par le métabolisme thrombocytaire est suffisante. La diminution de ce métabolisme entraîne alors un défaut de perméabilité de la membrane, le premier signe en serait une fuite de la phosphatase acide, puis la destruction de la membrane et la lyse de la cellule. Zucker et Borrelli en 1955 (192) avaient déjà noté que la sérotonine à l'état libre dans les thrombocytes, diffuse très rapidement dans le milieu ambiant lorsque ces éléments figurés ont un métabolisme modifié (par exemple, dans le cas d'un contact avec la thrombine).

Born et coll. en 1957 (23) ont montré de façon très précise que la capacité de fixer la sérotonine est fonction directe du taux en A.T.P. des plaquettes.

L'appréciation de ce taux comme un moyen de contrôle quantitatif de la valeur des milieux de conservation des plaquettes a même été préconisé par Maupin en 1959 (126). Ce même auteur signale en effet que l'activité physiologique des plaquettes vérifiée par exemple au thromboélastographe est liée directement à la présence d'un taux convenable d'A.T.P.

Cependant des auteurs comme Cohen et Gardner 1962 (48) estiment que seule la mesure de la durée de vie des throm-

bocytes est valable car la rétraction du caillot et la fonction thromboplastique peuvent être assurées par des plaquettes incapables de survie dans le torrent circulatoire.

En définitive, il est bien évident qu'assurer une bonne conservation des plaquettes se ramène à maintenir normal leur métabolisme. C'est dans la mesure où ce métabolisme sera mieux connu qu'il sera possible d'assurer cette conservation dans de meilleures conditions et d'en vérifier de façon précise le maintien.

---

## CHAPITRE III

# Enzymes et Métabolismes

### I. — *Activité respiratoire.*

Les travaux de Warburg, d'Onaka et de Loeber (184, 141, 106) laissaient entrevoir dès 1911, l'éventualité d'une respiration des plaquettes sanguines en suspension dans du plasma. C'est Endres et Kubowitz (1927) (66), Fujita (1928) (76) qui mesurèrent la quantité d'oxygène consommé par ces éléments, en utilisant la méthode manométrique de Warburg, et évoquèrent l'existence d'un pouvoir *glycolytique plaquettaire* avec libération d'*acide lactique* et de *gaz carbonique*.

Il faudra cependant attendre les travaux de Maupin en 1953 (122) pour connaître avec une extrême précision, tant sur la technique employée, que sur le degré de pureté des échantillons étudiés, la consommation moyenne en oxygène et le dégagement en acide carbonique.

Il trouve un dégagement de 7,8  $\mu$ l et une consommation d'oxygène de 8  $\mu$ l par milliard de plaquettes et par heure, ce qui lui permet d'établir un quotient respiratoire sensiblement égal à l'unité.

En ce qui concerne la consommation d'oxygène, en admettant qu'un milliard de plaquettes fraîches corresponde à 2,7 mg de poids sec, on obtiendrait 4  $\mu$ l par mg de poids sec et par heure. Ces constatations acquièrent alors une valeur extrême puisque ces chiffres représentent le QO<sub>2</sub> des plaquettes; le QO<sub>2</sub> correspondant, de façon générale, au nombre de  $\mu$ l d'oxygène consommé par milligramme de tissu sec et par heure.

Par l'étude des autres organites anucléées qui se trouvent également dans le plasma, c'est-à-dire les globules rouges, nous voyons que leur quotient respiratoire : QO<sub>2</sub> est très faible (0,02) soit environ 10 fois inférieur à celui des hématies nucléées d'oiseaux (0,17) qui est lui-même moins important que celui des autres cellules de l'organisme (de 10 à 30).

Ainsi le QO<sub>2</sub> des plaquettes se trouve être intermédiaire entre le QO<sub>2</sub> des cellules nuclées des tissus, qui est plus élevé et le QO<sub>2</sub> des autres organites anucléés du sang qui est plus faible.

Nous devons donc envisager tout d'abord les différences importantes qui existent entre l'activité respiratoire des globules rouges et celle des thrombocytes :

Pour les globules rouges si l'on se réfère à Cartier et Bou-

chard (1963) (40) : « La signification de cette faible consommation d'oxygène ( $QO_2 = 0,02$ ) est encore très controversée, mais il paraît toutefois exclu qu'elle puisse traduire un processus respiratoire. Car les modifications de la structure intracellulaire qui interviennent au cours de la maturation de la cellule rouge entraînent la disparition du noyau et des inclusions mitochondriales. Donc, les systèmes actifs qui s'y trouvent normalement localisés, c'est-à-dire la chaîne de *transporteurs d'électrons* et la *presque totalité des enzymes du cycle tricarboxylique* sont absentes dans l'érythrocyte à l'état de maturité ». Un peu plus loin ces mêmes auteurs vont jusqu'à dire : « Le globule rouge ne respire pas ». Pour les plaquettes, il en est différemment et malgré l'anucléation et la disparition d'un grand nombre de mitochondries, persiste une véritable respiration, qui bien que très inférieure à celle des cellules ordinaires est, comme le dit Chernyak et coll. (1961) (44) une « respiration modérée ».

Enfin, à signaler la présence d'enzymes des chaînes respiratoires malgré leur localisation mitochondriale, tels que la DPNH et la TPNH cytochrome-réductase dont l'existence a été signalée par « l'Ecole de Warburg ».

## II. — Métabolisme glucidique.

En dehors de leur activité propre, c'est-à-dire à l'état quiescent, le besoin en énergie des thrombocytes est minime : les réactions de synthèse, nécessitant une grande partie de l'énergie pour les autres cellules, sont ici moins intenses mais non abolies. Le maintien de la *charpente* cytoplasmique, les phénomènes de *perméabilité* et d'*échanges actifs* propres à chaque organisme vivant, les propriétés d'adhésivité sur lesquelles insistaient tant les anciens auteurs et celles d'agglomérabilité et de captage peuvent être davantage mises en avant aujourd'hui, constituent vraisemblablement les principaux processus endergoniques du thrombocyte. Ces besoins énergétiques sont apportés par la mise en jeu des enzymes de la chaîne classique d'Emden-Meyerhof et d'une façon accessoire par la dégradation du glucose selon le shunt des hexoses-monophosphates.

L'étape ultime de la métamorphose visqueuse de la plaquette et la rétraction du caillot entraîne une consommation considérable d'A.T.P. hydrolyse par l'A.T.Pase mise à son contact à ce moment-là.

### a) Les enzymes d'un catabolisme glucidique :

Le métabolisme des plaquettes est très actif bien qu'elles ne soient pas à proprement parler des cellules. R. Gross (1960) (84) souligne que l'activité glycolytique, même dans des conditions aérobies joue le rôle le plus important. *Plus de la*

*moitié du glucose a été trouvée par lui transformée en un temps donné, en pyruvate et en lactate; un cinquième seulement était transformé en gaz carbonique et en eau.*

Comme l'ont montré Campbell et coll. dès 1956-57 (37-38), Waller et R. Gross en 1959 (183) c'est la faible activité du cycle tricarboxylique qui provoque une grande concentration de lactate dans les plaquettes normales, et même en aéro-biose.

C'est la raison pour laquelle la majeure partie du pyruvate ne peut être oxydée et se trouve réduite en lactate.

Gross suggère que le glucose a servi à fabriquer du glyco-gène, des acides aminés et des lipides, étant donné que le quart du glucose consommé ne peut se retrouver, dans les produits métaboliques.

C'est donc par la voie anaérobie que la dégradation du glucose se produit essentiellement : les plaquettes ne pouvant oxyder l'acide pyruvique accumulent de l'acide lactique. Cette glycolyse met en jeu la séquence enzymatique cytoplasmique d'Embden-Meyerhof : tous les enzymes de la chaîne ont pu être déterminés quantitativement, même en ce qui concerne la phospho-gluco-mutase, plus récemment inventoriée (Löhr *in* Larrieu et coll. 1961) (105).

La glycolyse prédomine dans les plaquettes en ce qui concerne leur équipement enzymatique. Des enzymes de la voie principale, de la glycolyse, l'activité hexo-kinasique est la plus basse, suivie par l'activité di-phospho-fructo-aldolasique et l'activité fructose-6-phospho-kinasique.

Ainsi on doit donc considérer l'introduction du glucose comme le facteur limitant de l'activité glycolytique des plaquettes *in vitro*. Si on ajoute une hexo-kinase de levure hautement purifiée, le taux de la glycolyse plaquettaire peut être augmenté du double et c'est la formation de fructose-1-6-di-phosphate, catalysée par la fructose-6-phosphokinase qui devient la réaction limitante.

Les enzymes du shunt des hexosesmonophosphates sont également représentées dans les plaquettes, en particulier : la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la phospho-6-gluconate-déshydrogénase et la présence d'une transcétolase a été confirmée par Schettini et coll., 1961 (160).

Il semble, par contre, que la phospho-ribose isomérase et la transaldolase n'ont pu être encore déterminées, tout au moins quantitativement.

La voie des pentoses-phosphates répond à deux nécessités dans la cellule normale nucléée :

- formation de TPHN indispensable à certaines réactions de synthèse réductive,
- formation de ribose-5-phosphate utilisé dans la bio-

synthèse des nucléotides et des acides nucléiques dans les hématies, cette voie doit être considérée moins comme ayant un caractère fonctionnel que comme représentant un vestige du shunt présent dans les ancêtres de la lignée et pourrait peut-être intervenir dans le pouvoir de biosynthèse des plaquettes moins « atrophié » que celui des globules rouges.

Seules, la pyruvate-oxydase, l'iso-citrico-déshydrogénase, la succinate-déshydrogénase, la malico-déshydrogénase ont pu être déterminées quantitativement parmi les enzymes du cycle de Krebs (Löhr et coll., 1959-1961) (108, 110) et leur taux est faible par rapport à celui des enzymes de la glycolyse.

On peut donc penser qu'il s'agit là d'un reste de l'activité métabolique aérobie, dévolue à l'origine aux cellules mégacaryocytaires.

De plus, les plaquettes sont riches en glycogène ( $28 \pm 10$  M par  $10^{11}$  plaquettes, chez l'adulte, Gross 1960 (84) ce qui rapproche à ce moment, la composition des plaquettes beaucoup plus de celle du muscle que de celle des hématies qui n'en possèdent pas (Wagner 1946) (179) autrement qu'à l'état de traces. On peut donc s'attendre à ce que la glycogénolyse vienne se superposer à la glycolyse, et, de fait une phosphorylase plaquettaire permet, comme le souligne Gross 1960 (84) la formation du glucose-1-phosphate ou ester de Cori (G-6-P) aux dépens du glycogène. Elle scinde la liaison osidique 1-4 du glucose située à l'extrémité de la chaîne et transporte le radical glucosyl sur un acide phosphorique inorganique. D'où son nom de « glycogène-phosphate transglucosidase » (également Berni Canani 1961) (13).

Les plaquettes possèdent aussi les enzymes d'utilisation du fructose (fructose-1-phosphate-aldolase, 10 fois moins active que la fructose-1-6-diphosphate aldolase) : Schettini 1961 (161) et fructose-6-phosphokinase (Löhr in Larrieu et coll. 1961) (105).

#### b) *Anabolisme glucidique :*

Gross (1961) a émis l'hypothèse d'une synthèse du glycogène aux dépens de la partie du glucose consommé que l'on ne retrouve pas sous forme de métabolites.

### III. — *Métabolisme lipidique.*

#### a) *Lipases et hydrolases diverses.*

Pour Roskam (1924) (152), Nikolaeva (1946) (137) ou Alexander (1953) (2), la présence de lipase dans les plaquettes semble à exclure. Tout au plus peut-on citer la présence d'une faible quantité de lécithinase (Maupin 1953) (122) et une

acide  $\beta$ -hydroxybutyrique déshydrogénase (Koppel et Olwin 1954 (102-103), Balogh et coll. 1961 (9).

Cependant, les plaquettes sont assez riches en estérases diverses, notamment en cholinestérases, aliestérases et aryl-estérases, dont la répartition varie sensiblement suivant les différentes espèces animales.

Dans les plaquettes du bœuf, une sulfatase et une aryl-sulfatase ont été mises en évidence par Mizuno 1958 (131).

Dohrmann et Klesper et coll. (62) ont signalé la présence d'une  $\beta$ -glucuronidase.

La phosphatase acide occupe une place très importante parmi les enzymes plaquettaires, quant à la phosphatase alcaline sa présence semble fortement discutée.

#### b) *Enzymes de l'anabolisme lipidique.*

Maupin (1961) (128) montre la richesse des plaquettes en lipides, pour 100 g de poids sec il en donne 19 g et note que la prédominance des céphalines dans le groupe phosphatides est évidente puisque la lécithine ne constitue que 7 % de l'ensemble.

L'aspect qualitatif et fonctionnel, qui complète sans s'y opposer, l'aspect quantitatif, est caractérisé par la présence du facteur lipoidique thrombocytaire ou facteur 3, libéré par la lyse des plaquettes. Celui-ci réagit avec une série de facteurs plasmatiques s'activant en chaîne pour donner naissance à une thromboplastine plasmatique. Certains auteurs tels que : Bonnin 1957 (21), J. Caen et J. Bernard 1957 (33) pensent qu'il existerait deux facteurs plaquettaires thromboplastiques distincts. Il s'agit essentiellement d'un phospholipide dont la nature exacte reste en discussion. Folch a pu extraire du cerveau une phosphatidyléthanoline dont O'Brien (1956) a constaté que son activité est analogue à celle des plaquettes. D'autres auteurs, Baer 1960 (6), Seegers 1960 (165) attribuent également un rôle à la phosphatidyl-sérine.

Il reste donc à savoir si les plaquettes sont capables de synthétiser ces lipides ou non. Les renseignements que nous possédons à ce sujet sont malheureusement encore très fragmentaires.

L'incorporation plaquettaire du C 14, *in vitro*, est loin d'être négligeable pour les lipides neutres et les phosphatides comme l'observent Marks et coll. en 1960 (119). Firkin et Williams en 1961 (71) notent également la fixation rapide du P 32 au niveau des phospholipides thrombocytaires: phosphatidyl-éthanoline, phosphatidylcholine, inositol-phosphatide.

Cependant, Born et Esnouf en 1959 (25) n'ont pu mettre

en évidence que des traces d'uridine-phosphate, d'inosine-phosphate et cytidine-phosphate, ce que confirme partiellement Gross en 1960 (84). Ces traces de cytidine-phosphate seraient donc suffisantes pour rendre compte de la synthèse d'une substance type phosphatidyl-éthanolamine au cours de laquelle la présence de C.T.P. paraît indispensable (suivant le schéma classique de Kennedy).

#### IV. — *Métabolisme protidique.*

##### a) *Enzymes du catabolisme protidique.*

Malgré l'absence de pouvoir protéolytique chez les plaquettes affirmée par Roskam en 1924 et d'autres auteurs, le nombre des enzymes, susceptibles d'intervenir dans le catabolisme des protides et décelés dans les thrombocytes, est considérable.

Qu'il nous suffise de citer ici en allant des substrats les plus simples aux plus complexes :

L'histaminase, l'histidine-décarboxylase, la dopa-oxydase, l'absence de 5-hydroxytryptophane-décarboxylase (Gaddum et Giarman 1956) (77) étant évidemment à mettre en parallèle avec le rôle de transport assuré par les plaquettes vis-à-vis de la sérotonine, la glutathion-réductase, l'acide glutamique-déshydrogénase, la transaminase glutamique-oxalo-acétique et la transaminase glutamique pyruvique, le taux de la GOT étant toujours supérieur à celui de la GPT, la leucine aminopeptidase, un grand nombre de di- et de tripeptidases, une trypsinekinase, pas de chymotrypsine, diverses protéases.

Loewy et coll. ont proposé, en 1961 (107) de donner le nom de fibrinase, au facteur de stabilisation de la fibrine, que l'on peut considérer comme un enzyme.

##### b) *Enzymes de l'anabolisme protidique.*

Il apparaît intéressant de s'arrêter sur les acides aminés soufrés tels la taurine et la cystéine; la teneur en soufre total des plaquettes est considérable (1,7 à 1,9 mg de S par g de poids sec, pour Maupin et coll. 1962 (129) et une grande partie de ce soufre est sous forme de taurine qui est un constituant important, au moins en pourcentage, du milieu intra-cellulaire (Schram 1960) (163). La concentration dans les plaquettes est près de 200 fois supérieure à la concentration dans le plasma, ce qui fait poser le problème d'une grande sélectivité dans l'absorption, ou d'un fort pouvoir de synthèse.

Ayant injecté par la voie intraveineuse du sulfate de sodium marqué au S 35, Odell et coll. (139) dès 1955 signalèrent la fixation de ce dernier sur les mégacaryocytes de la moelle du rat et les plaquettes circulantes. On a un maximum

d'activités après 18 heures pour les mégacaryocytes, après 3 jours pour les plaquettes.

D'après Frendo et coll. (75) en 1959, les plaquettes humaines incorporent *in vitro* l'acide cystéique et mieux encore, la cystéine : le S 35 de la cystéine marquée se retrouve dans la taurine. L'importante teneur des plaquettes en taurine résulte donc d'une véritable synthèse probablement par la voie de l'acide sulfinique, de la cystéine et de l'hypotaurine (1,5 mg de taurine par g de poids sec, d'après Frendo et coll. 1959).

Par ailleurs, une thiosulfate-cyanure-sulfotransférase (appelée aussi Rhodanèse) a été identifiée dans les plaquettes sanguines de l'enfant par Schettini et coll. en 1960 (158, 159) :  $439,5 \pm 194$  microgrammes de thiocyanate sont synthétisés en soixante minutes à  $+ 38^{\circ}$  C par 1 milliard de plaquettes.

Schayer et Kobayashi en 1956 (157) ont montré la présence d'une histidine-décarboxylase dans les plaquettes du lapin mais non dans celles du rat, du cobaye et de l'homme. Notons que cet enzyme, indispensable à la synthèse de l'histamine, est présent dans la seule espèce, le lapin, dont les plaquettes sont connues comme étant riches en histamine (Zucker, 1959 (195); Maupin, 1960 (127). Chez l'homme, la teneur semble inférieure à  $0,1 \mu\text{g}$  pour  $10^9$  plaquettes (Nour-Eldin, 1962) (138).

Comme nous l'avons déjà indiqué, les plaquettes sont dépourvues de 5-HO-tryptophane-décarboxylase, enzyme qui intervient dans la synthèse de la sérotonine (Gaddum et Giarman, 1956) (77); ce fait montre bien que les plaquettes se limitent ici à un rôle de transport.

#### c) *Enzymes du métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides.*

Monso et Zucker, 1958 (132), n'ont pas pu trouver de ribonucléase, malgré la richesse relative des plaquettes en acide ribonucléique. Takeuchi, 1958, admet la présence en très faible quantité de ribonucléase, mais pas de désoxyribonucléase. Herriot et coll., 1961 (90), admettent le contraire : l'activité DNAsique dans les plaquettes serait 10 fois plus élevée que celle trouvée à l'état libre dans le sang et égale à celle du sérum.

On a décrit des nucléotidases actives sur divers substrats : adényl-5-phosphatase (Storti, 1953) (169); (Pedrazzini et Salvidio, 1956) (142); apyrase (Morita, 1956) (133); adénylatekinase (myokinase) (Waller, Lohr et coll., 1959) (183); nucléotidase de Salvidio, 1953 (154) et Fieschi, 1955 (70).

De nombreux auteurs ont montré l'immense intérêt qu'il convient de porter à l'ATPase et dont il faut distinguer deux

variétés; la  $Mg^{++}$  ATPase, la plus abondante : 131 unités Bücher pour  $10^{11}$  plaquettes et la  $Ca^{++}$  ATPase avec 91 unités.

La *thrombosthénine*, décrite par Bettex et Luscher, 1961 (17), très voisine de l'ATPase est le seul enzyme plaquettaire qui ait été obtenu sous forme hautement purifiée.

Son rôle sera repris à l'état physiologique et à l'état pathologique dans les chapitres ultérieurs. Nous ajouterons une créatine-phosphokinase décrite par Löhr et coll. (1961) (110).

Pour conclure, les plaquettes possèdent un métabolisme assez élevé, préparant des liaisons hautement énergétiques. C'est de beaucoup la glycolyse qui domine dans ce métabolisme. L'adénosine-triphosphate est la principale source d'énergie. La guanosine-triphosphate n'a été décelée qu'en petite quantité, la cytidine phosphate seulement à l'état de traces.

Mais de plus, grâce probablement en partie à la conservation d'une certaine activité respiratoire et des enzymes du shunt des hexoses monophosphates, disparus des hématies, les plaquettes ont conservé un pouvoir de synthèse qui semble plus important que celui des globules rouges. Ce pouvoir de synthèse, bien que très mal connu se manifeste encore pour les protides, les glucides et les lipides.

---

# Enzymes et fonctions

L'étude de l'équipement enzymatique des plaquettes est fort récente et l'on conçoit bien aisément que les travaux d'interprétation du comportement plaquettaire en fonction des caractères de leur métabolisme soient encore plus nouveaux et assez fragmentaires.

Le rôle des plaquettes est multiple et certains auteurs, malgré des discussions soulevées par le rôle vasoconstricteur de la sérotonine, admettent qu'elles interviennent à tous les stades de l'hémostase.

- 1<sup>er</sup> temps pariétal : action vasculotonique (sérotonine).
- 2<sup>e</sup> temps plaquettaire : adhésivité et agglutination;
- 3<sup>e</sup> temps plasmatique : facteur prothromboplastique lipidique, surtout;
- 4<sup>e</sup> temps thrombodynamique : rétraction du caillot (la fibrine ne jouant probablement qu'un rôle passif).

Si avec Hugues, 1959 (94), on examine de plus près la formation du clou hémostatique, dont les plaquettes constituent à proprement parler le matériau, on s'aperçoit que le phénomène se déroule en trois temps.

1. Accolement précoce des plaquettes aux lèvres des vaisseaux sectionnés.
2. Formation d'un agrégat plaquettaire volumineux mais perméable et fragile.
3. Imperméabilisation du thrombus qui fonctionne comme une capsule destinée à obturer le vaisseau.

La première phase, très rapide, pourrait être purement passive en ce qui concerne les plaquettes, comme certaines observations récentes de Bounameaux en 1959 (29) semblent le montrer.

Les deux dernières sont dues à la *métamorphose visqueuse* (MV) : elles sont inhibées par les mêmes substances que la MV et vont de pair avec une même évolution morphologique des thrombocytes (Hugues en 1959) (94).

Le terme de métamorphose visqueuse a été créé en 1885 par Eberth et Schimmelbusch (65), il correspond à l'évolution complexe que subissent les plaquettes à ce moment-là. Il reste d'observation délicate comme le montrent les figures obtenues au microscope à contraste de phase par Sokal en

1960 (167) et au microscope électronique par Rodman et coll. en 1963 ainsi que les deux stades décrits par Sokal : 1<sup>er</sup> stade, agglutination par fusion des hyalomères; 2<sup>e</sup> stade, concentration des agglutinats et fusion des granulomères, et reste de toute façon non mesurable.

C'est la raison pour laquelle bien des auteurs préfèrent avoir recours à l'appréciation de la rétractibilité du caillot, en effet les deux phénomènes ont partie liée, à supposer qu'ils ne se confondent pas.

De plus, ce phénomène de rétractibilité et la fonction qu'il définit, ne manque pas d'évoquer le phénomène de contractilité. Ainsi peut-on penser à un rapprochement, avec la contractilité musculaire elle-même, tout au moins à une analogie qu'il va falloir justifier.

Il faudrait étudier successivement donc :

— Parallèle entre l'équipement enzymatique des plaquettes et celui du muscle strié.

— Parallèle entre la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot.

— Agglutination et agrégation des plaquettes.

— Fonctions de captation et de transport.

Toutefois, seuls les deux premiers aspects entrent dans le cadre de cette étude et seront abordés ici.

1) *Parallèle entre l'équipement enzymatique des plaquettes et celui du muscle strié.*

L'analogie entre l'équipement enzymatique des plaquettes sanguines et celui du muscle strié, voire même entre leurs métabolismes, a été bien défendue par l'école de Marburg.

A la suite des travaux de Gross en 1960 (84) on peut se représenter ainsi ce parallélisme.

Le contenu en glycogène des plaquettes égal à  $20 \pm 10$  M pour  $10^{11}$  éléments est une teneur très élevée et analogue à celle des muscles du squelette comme l'a déterminé Gross.

Dans son ensemble, les plaquettes renferment environ 1/10 de tous les enzymes glycolytiques du muscle squelettique, cela représente une teneur 10 fois plus élevée que pour les érythrocytes. Ainsi, dès le départ une comparaison possible entre le métabolisme des plaquettes et celui des muscles striés se trouve ébauchée.

R. Gross a montré que si les plaquettes, contrairement aux muscles, renfermaient peu de créatine-phosphate-kinase et de créatine phosphate, elles possédaient encore à une haute concentration les enzymes libérant le radical phosphate, ainsi que

la phosphatase acide, mais par contre une teneur beaucoup plus faible des érythrocytes et du muscle squelettique en phosphatase alcaline. Le muscle cardiaque représenterait ainsi une sorte d'intermédiaire entre les plaquettes et le muscle squelettique, quant au contenu de ces éléments en enzymes. Pour l'ATP, Gross a estimé la teneur en ce nucléotide à une valeur environ 3 fois plus importante, c'est-à-dire en définitive, 21,5 micromoles d'ATP par  $10^{11}$  plaquettes.

Ainsi, à l'issue de ces constatations, nous pouvons reprendre avec Gross la concordance qu'elles permettent d'établir avec la théorie développée par Bücher et coll. en 1958 (31), Delbruck et coll. en 1959 (136) et Vogell la même année (178), sur l'équipement enzymatique et l'ultra structure de certains muscles de la sauterelle africaine (*Locusta migratoria*). Il y a lieu de distinguer ici le muscle du vol et le muscle du saut. Le muscle du vol contient chez cette sauterelle beaucoup de mitochondries, une teneur élevée en enzymes du cycle tricarboxylique, et des trachéoles spéciales. Le muscle sauteur du même animal fonctionne seulement périodiquement avec de longs intervalles de repos, et de manière explosive. Il n'a pas de trachéoles, très peu de mitochondries mais beaucoup d'enzymes de la glycolyse.

Les plaquettes, s'il est permis de poursuivre ce parallèle, correspondraient, d'après Gross, à ce dernier type.

Les plaquettes ne s'engagent qu'une seule fois au cours de leur existence, dans une dépense d'énergie : pendant la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot. C'est à ce phénomène que correspondrait biochimiquement la prédominance de la glycolyse et un nombre restreint de mitochondries. Comme le fait encore remarquer Gross, 1961 (85), la distribution qualitative des enzymes plaquettaires ressemble à celle du muscle. Contrairement au muscle qui élimine l'acide lactique, qui n'a pu être oxydé au cours de la phase active, les plaquettes n'ont pas besoin de cette phase de récupération puisqu'une fois leur fonction accomplie, elles ont subi des dommages irréversibles.

En 1959, Bettex-Galland et Lüscher (15) ont réussi à isoler à partir de thrombocytes humains normaux, une protéine contractile qui possède les propriétés d'une ATPase et dont le précipité obtenu a une force ionique voisine de 0,1 M et de pH 6,3 à 6,9 se contracte sous l'influence de l'ATP en présence d'ions  $Mg^{++}$ . Ce qui nous entraîne assez loin dans la comparaison.

Ces mêmes auteurs en 1961, après avoir obtenu cette protéine sous forme purifiée et en avoir étudié en détail les propriétés, admettent qu'elle appartient au groupe de l'actomyosine, mais qu'en raison des quelques différences qu'elle pré-

sente avec les autres protéines contractiles et étant donné son origine et sa fonction, proposent de la nommer thrombosthénine (15). De même ces auteurs estiment que la protéine contractile qu'ils ont isolée des plaquettes représente environ 15 % des protéines totales des thrombocytes humains, soit 1 à 3 % de leur poids frais. Hoffmann-Berling en 1956 (93) a calculé d'autre part que les protéines contractiles des cellules indifférenciées, ne représentent que 0,1 à 0,2 % du poids de tissu frais. Le muscle, par ailleurs, renferme 10 à 12 % d'actomyosine par rapport au poids frais.

Ces résultats semblent donc indiquer un degré déjà poussé de différenciation des thrombocytes et cette thrombosthénine serait alors le support de la rétraction du caillot *in vitro*.

## 2. Parallèle entre la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot.

Un deuxième point de vue est encore à souligner : R. Gross en 1960 (86) admet que la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot sont des phénomènes combinés, utilisant une grande quantité d'énergie et étroitement liés au métabolisme des glucides. Il rejoint ainsi les travaux de Born (1955-1959) (22, 25), de Lüscher (1956) (113) et de quelques autres.

Trois séries d'arguments viennent soutenir les affirmations de ces auteurs :

a) Le parallélisme qui existe *in vitro*, sous l'influence de différents inhibiteurs enzymatiques entre la diminution de l'activité enzymatique spécifiquement inhibée et la chute du taux d'ATP d'une part et la perte de la rétraction du caillot d'autre part.

Le mono-iodacétate, inhibiteur de glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase a été pour Gross, parmi tous les bloqueurs d'enzymes le plus efficace dans l'inhibition de la rétraction du caillot. Sur 150 expériences l'auteur montre qu'avec 1 micro-mole par litre il n'y a aucune inhibition, mais avec 10 micromoles il obtient une inhibition de 10 %, avec 50  $\mu$ M 30 % et avec 100  $\mu$ M une inhibition de 90 %. Le fluorure, inhibant la glycolyse au stade d'intervention de l'énolase, abolit la rétraction à la concentration de 1 millimole par litre.

Dans les mêmes conditions, le malonate qui inhibe compétitivement la succino-déshydrogénase et le cyanure qui agit sur le ferment respiratoire de Warburg, diminuent l'activité de 1/10.

De même, Bettex-Galland et Lüscher en 1959 (15) avaient constaté une inhibition de la rétraction en présence de 3,5

dinitro-benzoylglucosamine, qui est un inhibiteur de l'hexokinase.

Il est à noter cependant que les mêmes auteurs n'ont pu mettre en évidence de relation significative entre respiration et rétraction alors que la glycolyse est augmentée manifestement au début de la rétraction déclenchée par la thrombine.

b) L'interprétation qui s'impose est que la rétraction nécessite de l'énergie qui est apportée essentiellement sous forme d'A.T.P.

Depuis 1958 avec les travaux de Born (24), il est connu que les plaquettes présentent un taux élevé d'A.T.P. et que ce taux diminue au cours de la rétraction pour atteindre un minimum environ 15 minutes après la coagulation.

Pour Gross une concentration optimum d'A.T.P. d'environ 50 % de la normale correspond à la capacité du caillot de se rétracter.

Cette chute décisive de l'A.T.P. a lieu dans les dix premières minutes, c'est-à-dire avant que la rétraction ne soit visible. En effet, procédons comme Gross sur une série d'échantillons semblables de plasma humain enrichi en plaquettes : prenons à différents intervalles des photographies des caillots en cours de rétraction et interrompons le processus métabolique, avec de l'acide trichloracétique à 6 % et refroidi. Il est important de neutraliser le mélange en utilisant un tampon phosphate dans les deux minutes car l'A.T.P. est extrêmement sensible aux valeurs inférieures de pH. On détermine le taux d'A.T.P. au « lower columns » par la technique de Fonio-Henseler et dans ces conditions, Gross a constaté que la diminution du taux d'A.T.P. précède la rétraction. L'A.T.P. dans la plaquette intacte se trouve protégé contre la destruction qui serait due à l'A.T.P.ase. Selon toute vraisemblance la mise en contact de l'A.T.P. et de l'A.T.P.ase aurait lieu au moment de la métamorphose visqueuse (Waller et coll. en 1958) (182).

c) On note toujours des modifications de l'intensité de la glycolyse ou du taux d'A.T.P., que nous verrons plus loin, dans les cas de thrombasthénies avec leur métamorphose visqueuse troublée et leur irrétractilité.

Le système glycolytique très développé des plaquettes est susceptible d'être activé au début de la rétraction; le pouvoir rétractile plaquettaire est en relation avec la teneur en A.T.P. et cet A.T.P. est consommé au cours de la rétraction du caillot.

Tous ces faits, ainsi que la mise en évidence d'une protéine contractile au niveau des plaquettes, nous montrent donc une analogie assez poussée entre le mécanisme de la rétraction et

celui de la contraction musculaire. En réalité le phénomène est beaucoup plus complexe, et les facteurs capables d'entrer en jeu sont beaucoup plus nombreux.

Actuellement on a de nombreuses raisons de penser que la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot ne sont que deux expressions différentes de la capacité rétractile des plaquettes s'exerçant dans le premier cas en l'absence de fibrine, et dans le second cas, en présence de cette protéine.

Les conditions préliminaires sont identiques (plaquettes fraîches, milieu isotonique, de pH et de température physiologiques en présence des ions  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ ). Les deux phénomènes sont induits par la thrombine (Lüscher, 1959) (115). La lenteur de la rétraction s'explique par l'action freinatrice du réseau de fibrine (Lüscher, 1961) (116).

---

## Les modifications enzymatiques plaquettaires au cours de la maladie de Glanzmann

La maladie de Glanzmann ou thrombasthénie hémorragique, héréditaire, ayant semble-t-il une transmission du mode récessif autosomique avec atteinte des deux sexes de façon égale, se caractérise cliniquement surtout par des épistaxis, moins souvent par des gingivorragies, des ménorragies ou des poussées purpuriques.

Du point de vue biologique on trouve :

1. Un taux de plaquettes normal.
2. Une irrétractilité du caillot, souvent totale (ce que confirment les épreuves croisées plaquettes-sérum avec un témoin qui montre que ce trouble est dû aux plaquettes et également l'aspect du thromboélastogramme (Larrieu et coll., 1961) (105), avec absence d'agrégation et de métamorphose visqueuse.
3. Un allongement du temps de saignement, critère qui peut cependant manquer ou varier avec le temps.
4. Des plaquettes anormales : rondes, souvent petites, toujours isolées sur lames. Le défaut de formation de pseudopodes et l'absence de métamorphose visqueuse sont révélés par l'examen en microscopie interférentielle ou en contraste de phase. Au microscope électronique on confirme ces observations : vacuolisation importante avec développement anormal des éléments clairs, raréfaction des mitochondries, Jean 1961 (100). Robineaux (in Larrieu) en 1961 (105) constate l'augmentation du volume des mitochondries et un petit nombre de vacuoles dans les plaquettes thrombasthéniques.
5. La coagulation proprement dite est en principe normale, le facteur 3, plaquettaire étant libéré normalement. Cependant il n'y a pas de rétraction du caillot parce que les plaquettes thrombasthéniques sont incapables de subir la métamorphose visqueuse. Lüscher en 1961 (116) pense que le déficit responsable peut théoriquement se localiser :
  - a) Dans le métabolisme des glucides, plus particulièrement dans le système enzymatique de la glycolyse.
  - b) Dans le métabolisme de l'ATP.
  - c) Au niveau du système contactile (thrombosthénine).

On peut évidemment envisager de nombreuses autres possibilités en particulier en ce qui concerne l'interaction thrombine-plaquettes dont on n'a pas encore élucidé le mécanisme biochimique (Maupin, 1961) (128).

On avait déjà pu se faire une idée de l'importance du système glycolytique des plaquettes dans la rétractilité du caillot avec les travaux de Lüscher (1956) (112) et en 1961 (116), de Bounameaux (1956) (26), de Born (1958) (24). Mais l'Ecole de Marburg est allée plus loin encore en permettant de concevoir le mécanisme physiopathologique de la maladie de Glanzmann comme une importante anomalie enzymatique plaquettaire.

On peut donc, comme l'affirme Gross en 1961 (87), considérer la maladie de Glanzmann-Naegeli comme un exemple d'enzymopathie plaquettaire. Sur 5 malades présentant un défaut de métamorphose visqueuse au niveau de leurs plaquettes avec irrétractilité du caillot sans que la coagulation proprement dite cesse d'être normale, Gross a mis en évidence le fait que deux « enzymes clefs » de la glycolyse ont perdu de leur activité : il s'agit de la glyceraldéhyde phosphate dés-hydrogénase (G.A.P.D.H., enzyme de la fermentation oxydative de Warburg) et de la pyruvate-kinase (G.P.K., enzyme transportant le second phosphate de Warburg). Toutes les autres activités enzymatiques sur 28 dosées étaient normales voire même augmentées.

L'incubation de ces plaquettes déficientes avec du glucose, par comparaison avec des plaquettes normales, montre une diminution de la consommation du glucose, la formation de lactate et une accumulation du glucose-6-phosphate, ce qui permet de penser à un blocage incomplet de la glycolyse au stade de la réaction de fermentation oxydasique. Le déficit enzymatique correspondant à la G.A.P.D.H. paraît le plus important, en effet l'activité pyruvate-kinasique restante est suffisante pour métaboliser le phospho-énol-pyruvate formé.

On va donc trouver dans les plaquettes un taux d'A.T.P. d'environ 50 % et un rapport A.T.P./A.D.P. qui passe de 3,1 valeur normale à 0,9 ou 2,4.

Pour confirmer cette interprétation, Gross réussit à normaliser la rétraction du caillot par addition d'ions  $Mg^{++}$  et d'A.T.P. Le phénomène est d'ailleurs complexe et d'explication difficile car l'A.T.P. ajouté seul inhibait la rétraction faible ou nulle ne produisant qu'une rétraction induite par l'A.T.P. en présence d'ions  $Mg^{++}$ , que des quantités dépassant largement la marge physiologique, d'ions  $Mg^{++}$  étaient parfois nécessaires pour obtenir une rétraction franche du caillot. Nous reviendrons sur ce point à l'occasion.

Se pose alors la question de la conception, elle aussi, enzy-

matique, de l'irrtractilité du caillot proposée par Glanzmann lui-même, en 1918, qui attribuait ce caractère pathologique à la disparition ou à l'inhibition d'un enzyme plaquettaire : le rétracto-enzyme qui d'ailleurs n'a pas été isolé. Nous devons admettre avec Gross, que l'absence de glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase est le défaut enzymatique chromosomal de base.

Le déficit en A.T.P. dû probablement à l'anomalie enzymatique, suffisait dans ces cas à expliquer l'irrtractilité du caillot et l'absence de métamorphose visqueuse, qui lui est parallèle. Mais on peut se demander s'il en est toujours ainsi.

Buscher et Baumgartner en 1958 avaient déjà décrit un cas de thrombasthénie où l'activité glycolytique serait restée normale. Un dosage ultérieur des activités GAPDH et PK dans les plaquettes de cette même malade ont fourni des valeurs normales (Bettex-Galland et Baumgartner, 1960) (18) (*in Bettex-Galland et Maupin, 1961*).

En 1961, Löhr, Waller et Gross (110), dans une étude sur huit cas de thrombasthénie, ont pu séparer deux lots différents : un premier lot présentant le double déficit enzymatique déjà mentionné (GAPDH et PK) ; un deuxième lot ne comportant qu'une atteinte de la  $Mg^{++}$  ATPase et possédant une valeur normale en enzyme de la glycolyse.

Mais c'est en 1961 que l'Ecole de Jean Bernard avec Mme Larrieu, J. Caen et J.C. Lelong (105) a insisté sur cette distinction à propos de cinq nouvelles observations. Sur trois de leurs malades les anomalies enzymatiques déjà signalées plus haut par Gross en 1960 étaient alors retrouvées avec une perturbation de la glycolyse et une chute du taux d'ATP. Sur les deux autres malades les taux de GAPDH, de PK et d'ATP étaient normaux mais présentaient un abaissement de la  $Mg^{++}$  ATPase. A noter cependant que dans ces deux groupes l'adjonction d'ATP et de  $Mg^{++}$  en quantité suffisante « corrige » *in vitro* le défaut de rétraction du caillot.

Quelles sont donc les explications à ce mécanisme physiopathologique du syndrome de Glanzmann ?

Larrieu et coll. pensent qu'il existe un double mécanisme enzymatique. D'une part il s'agirait d'une insuffisance de production d'ATP, et d'autre part d'une non-utilisation de l'ATP existant. Cependant dans les deux cas on peut envisager des inter-réactions d'ordre enzymatique que seules de nouvelles recherches permettront de préciser.

Si dans l'un et l'autre groupe de malades de ces derniers auteurs on obtient une normalisation *in vitro* de la rétractilité du caillot par adjonction d'ATP et de  $Mg^{++}$ , à l'instar de Gross est-ce une raison suffisante pour affirmer comme ce

dernier que « ces expériences montrent que le défaut de la thrombasthénie (thrombopathie de Glanzmann-Naegeli) ne peut être situé au niveau de l'actomyosine des plaquettes découverte récemment par Bettex-Galland et Luscher » (43). Il nous faut donc insister sur le fait souligné par Gross qu'une haute concentration en  $Mg^{++}$  est nécessaire avec l'ATP pour obtenir *in vitro* une rétraction normale. L'auteur émet les hypothèses suivantes : les ions  $Mg^{++}$  joueraient le rôle d'effecteur vis-à-vis des ATPase; ou bien ils reconstitueraient les « ponts » actine-myosine détruits par l'ATP; ou bien encore ils déplaceraient le rapport entre deux formes d'ATP, ATP résiduel et ATP disponible sous la forme  $Mg^{++} - ATP$ , le rapport optimum entre ATP et magnésium étant de l'ordre de 1 1.6 M. Mais quelle que soit l'hypothèse envisagée, le recours à un défaut de la protéine contractile découverte par Bettex-Galland et Luscher est exclu (15).

En effet, dans le cas étudié par Bücher et Baumgartner *in* Bettex-Galland et Maupin en 1961 (18) la rétraction ne se normalise pas par addition de  $Mg^{++}$  et d'ATP, de plus, le taux de la protéine semble normale. Mais les difficultés d'extension des plaquettes humaines sont énormes et le problème reste en suspens.

De plus, les déficiences enzymatiques et les troubles métaboliques de la glycolyse plaquettaire ne sont pas sans modifier les autres métabolismes, en particulier celui des mono-peptides plaquettaires et au niveau des groupements thiols.

---

## Conclusion

Un rapport consacré aux enzymes plaquettaires se serait limité, il y a moins de dix ans, à quelques lignes, alors que dans cette dernière décennie, les travaux se sont multipliés. Non seulement on a procédé à l'inventaire de la richesse en enzymes des thrombocytes plus de 80 activités enzymatiques ont été signalées dans cet étonnant « échantillon » cytoplasmique mais on s'est appliqué, dans certains cas, tout au moins, à prouver leur individualité par rapport à celle des ferments analogues des autres éléments du sang; à établir leur origine, à préciser leur localisation et à suivre leur devenir tant *in vivo* au cours du vieillissement des plaquettes que *in vitro* au cours de leur conservation. On a surtout cherché à faire le point entre la présence de ces enzymes et la nature des métabolismes auxquels ils sont sensés présider et à dégager de cet ensemble les significations fonctionnelles effectives aussi bien à l'état normal qu'à l'état pathologique.

Ainsi s'est-on rendu compte que, bien que privées de noyaux comme les globules rouges arrivés à maturité, les plaquettes ont gardé un équipement enzymatique plus étoffé et une activité respiratoire non négligeable. Grâce probablement à la persistance d'un certain nombre de mitochondries et de microsomes, le métabolisme des plaquettes reste assez intense. Basé essentiellement sur les phénomènes de glycolyse en regard de l'activité moins accusée du cycle tricarboxylique et de la voie des pentoses phosphates, il permet l'accumulation dans les plaquettes de quantités considérables d'énergie sous la forme d'adénosine-triphosphate.

Mais de plus, grâce en partie au maintien d'une certaine activité respiratoire et des enzymes du shunt des hexoses monophosphates que les hématies ne possèdent pratiquement plus, les plaquettes ont conservé un pouvoir de synthèse qui semble beaucoup plus important que celui des globules rouges, et qui, si imparfaitement connu qu'il soit encore, se manifeste sur le plan des glucides, des lipides et des protides. Il est certes encore assez mal connu, mais cependant la glycolyse semble y occuper une place prépondérante. Au cours de leur existence, les plaquettes ne s'engagent qu'une fois dans une grande dépense d'énergie, pendant la métamorphose visqueuse et la rétraction du caillot. C'est à ce phénomène que correspondait biochimiquement la prédominance de la glycolyse et un nombre relativement restreint de mitochondries. D'où également la comparaison avec le fonctionnement de certains muscles ne se contractant qu'à larges intervalles de repos et de manière explosive et vis-à-vis desquels les plaquettes se situent comme un cas limite. Les plaquettes dis-

posent donc d'un système glycolique très développé, susceptible d'être activé au début de la rétraction; leur pouvoir rétractile se trouve en relation avec la teneur en ATP, cet ATP étant consommé au cours de la rétraction du caillot. Mais relativement à l'agrégation des plaquettes, l'ATP et l'AMP agiraient plutôt comme inhibiteurs, et l'ADP au contraire comme agent favorisant. Quant aux fonctions de captation et de transport assurées normalement par les plaquettes, pour un grand nombre de substances parmi lesquelles la sérotonine, elles restent sous la dépendance du taux thrombocytaire d'ATP.

Du point de vue pathologique, la maladie de Glanzmann se présente comme une importante anomalie enzymatique plaquettaire caractérisée essentiellement par la perte d'activité des deux enzymes clefs de la glycolyse : la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la pyruvate kinase (PK) et une chute consécutive du taux d'ATP. Ceci est le cas le plus général, cependant chez quelques malades il a été signalé des taux normaux de GAPDH, PK et ATP mais avec déficience en ATPase. En dehors des thrombopathies, les résultats encore très fragmentaires ne sauraient faire méjuger de l'intérêt qui s'attache au développement, dans ce domaine comme dans beaucoup d'autres, de l'enzymo-pathologie. La prospection méthodique, sous cet angle, de toutes les affections où l'on peut soupçonner une diminution de l'équipement enzymatique plaquettaire, permettra seule au fur et à mesure du développement des techniques, une vue d'ensemble précieuse pour la clinique. C'est au perfectionnement et à la généralisation des microméthodes d'isolement des plaquettes et d'investigations enzymologiques qu'il faut attendre une influence décisive en la matière.

Vu :

Clermont-Ferrand, le 14 février 1966.

*Le Président,*

G. DASTUGUE.

Vu :

Le 16 février 1966.

*Le Doyen,*

G. MEYNIEL.

Clermont-Ferrand, le 21 février 1966.

14/66 — Vu et permis d'imprimer.

*Le Recteur,*

E. LAPALUS.

# Bibliographie

1. AEBERHARDT A. — Rev. Hémat., 1956, **11**, 426.
2. ALEXANDER B. — Academic Presse Inc., 1953, p. 75.
3. ARVY L. — Biol. Méd., 1958, **47**, 12-160.
4. AUGUSTINSSON K.B., DATTA N., GRAHN M., ZAJICEK J. — Nature Paris, 1952, **169**, 800.
5. BABINI B., CACCIARI E., MUSIANI S. — Haematologica, 1960, **45**, 305.
6. BAER. — Detroit March, 1960, Boston, Little Brown and C°, 1961.
7. BALDINI M., EBBE S., DAMESHEK W. — Blood, 1960, **15**, 909.
8. BALDINI M., COSTEA N., DAMESHEK W. — Blood, 1960, **16**, 1669.
9. BALOGH K., COHEN R.B. — Blood, 1961, **17**, 491.
10. BASTIDE P., JACQUEMET L., SIMON E., PLAT P.M., DASTUGUE G. — Path. Biol., 1962, **10**, 1519.
11. BASTIDE P., PLAT P.M., LAPORTE J. et DASTUGUE G. — C. R. Soc. Biol., Paris, 1964, **158**, 1517.
12. BEHRENDT H. — Vol. 1, Springfields, Charles C., Thomas ed., 1957.
13. BERNI CANANI M., REA F., SCHETTINI F. — Boll. Soc. ital. Biol. Sper., 1961, **37**, 1201.
14. BESSIS M. — Sang., 1940, **14**, 262.
15. BETTEX-GALLAND M., LUSCHER E.F. — Helv. physiol. pharmacol. Acta, 1959, **17-3**, C.14.
16. BETTEX-GALLAND M., LUSCHER E.F. — Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.), 1960, **4**, 178.
17. BETTEX-GALLAND M., LUSCHER E.F. — Biochim. Biophys. Res. Commun., 1961, **49**, 536.
18. BETTEX-GALLAND M. et MAUPIN B. — Hémostase, 1961, **1**, 375.
19. BIGELOW F.S. — J. Lab. clin. Med., 1954, **43**, 759.
20. BIGGS R. and MAC FARLANE R.G. — 1 Vol., Springfields CH C, Thomas edit., 1953.
21. BONNIN J. — Blood, 1957, **12**, 728.
22. BORN G.V.R. — J. Physiol. (Lond.), 1955, **133**, 61.
23. BORN G.V.R., INGRAM G.J.C., STACEY R.S. — J. Physiol. (Lond.), 1957, **135**, 63P.
24. BORN G.V.R., INGRAM G.I.C. and STACEY R.S. — Brit. J. Pharmacol., 1958, **12**, 62.
25. BORN G.V.R. and ESNOUF M.P. — Congress Biochemistry Vienna, New-York, Pergamon edit., 1959.
26. BOUNAMEAUX Y. — Experientia (Basel), 1956, **12**, 355.
27. BOUNAMEAUX Y. — Rev. franç. Etud. clin. biol., 1957, **1**, 52.
28. BOUNAMEAUX Y. — Rev. Hémat., 1957, **12**, 16.
29. BOUNAMEAUX Y. — C. R. Soc. Biol (Paris), 1959, **153**, 865.
30. BRAUNSTEINER H., PAKESCH F., SAILER S. — Acta Haemat. (Basel), 1960, **24**, 311.
31. BÜCHER T. und BAUMGARTNER W. — Schweiz. med. Wschr., 1958, **88**, 753.
32. CACCIARI E., BABINI B. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1960, **36**, 299.

33. CAEN J. et BERNARD J. — Rev. franç. Etud. clin. Biol, 1957, **11**, 1038.
34. CAEN J. et HASS Fr. — Rev. franç. Etud. clin. biol., 1960, **5**, 146.
35. CAMPELL E.W., SMALL W.J., DAMESHEK W., LO PILATO E. and MEDNICOFF I. — J. Lab. clin. Med., 1956, **47**, 835.
36. CAMPELL F.W., SMALL W.J. — J. clin. Invest., 1956, **35**, 625.
37. CAMPELL E.W., SMALL W.J., DAMESHEK W. — J. Lab. clin. Med., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1957, **94**, 505.
38. CAMPELL E.W., SMALL W.J., LO PILATO E., DAMESHEK W. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1957, **94**, 505.
39. CAMPELL E.W., SMALL W., LO PILATO E. — Proc. 6<sup>e</sup> Congr. intern. Soc. Hemat. (Boston), ed. by Richardson Jones, 1956, p. 523, New-York, Grune et Statton, 1958.
40. CARTIER P. et BOUCHARD M. — Rev. franç. Etud. clin. biol., 1963, **8**, 393.
41. CHERNYAK N.B., SVENTSINSKAYA M.B., GUSEINOV Ch.S. — Probl. Geriatr., 1960, **5**, 39.
42. CHERNYAK N.B., SVENTSINSKAYA M.B., GUSEINOV Ch.S. — Byull. éksp. Biol. Med., 1960, **49**, 51.
43. CHERNYAK N.B., GUSEINOV Ch.S. — Dokl. Akad. Nauk. SSSR, Otd. Biol., 1963, **133**, 158-160.
44. CHERNYAK N.B. — Vop. med. Khim., 1961, **7**, 339.
45. CHEVILLARD L. et HAMON F. — C. R. Soc. Biol (Paris), 1945, **139**, 286.
46. COHEN P. and GARDNER F.H. — J. Clin. Invest., 1959, **38**, 995.
47. COHEN P. and GARDNER F.H. — Clin. Res., 1960, **8**, 207.
48. COHEN P. and GARDNER F.H. — J. Clin. Invest., 1962, **41**, 1.
49. COHEN P. and GARDNER F.H. — J. Clin. Invest., 1962, **41**, 10.
50. COPLEY A.L., HOULIHAN R.B. — Blood Spec. Issue, n° 1, New-York, Grune and Stratton ed., 1947, 170.
51. COPLEY A.L. et BALEA T. — Sang, 1955, **26**, 841.
52. COPLEY A.L., BALEA T. et VO-VINH-HOA. — Rev. Hémat., 1956, **11**, 324.
53. COURTOIS J.E. — Ann. Biol. clin., 1959, **17**, 551.
54. DALE R.A. — Clin. chim. Acta, 1960, **5**, 652.
55. DASTUGUE G., JACQUEMET L., BASTIDE P., SIMON E., PLAT P.M. — VIII<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hematol. Vienne (2 août-2 sept. 1961), Basel, Karger ed., 1962.
56. DASTUGUE G., JACQUEMET L., BASTIDE P., SIMON E., PLAT P.M. — A paraître.
57. DASTUGUE G., BASTIDE P. et PLAT P.M. — Ann. Biol. clin., 1964, **22**, p. 227-324.
58. DATTA N., ZAJICEK J. — Acta Haemat., 1954, **12**, 81.
59. DELBRUCK A., ZEBE E. und BUCHER T. — Biochem. Z., 1959, **331**, 273.
60. DETWILER T.C., ODELL T.T. et Mac DONALD T.P. — Amer. J. Physiol., 1962, **203**, 107.
61. DILLARD C.H.L., BRECHER G. and CRONKITE E.P. — Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.), 1951, **78**, 796.
62. DORHMANN R., KLESPIER R. — Klin. Wschr., 1960, **38**, 595.
63. DREYFUS J.Cl. et SCHAPIRA G. — Rev. Franç. Etud. clin. biol., 1960, **5**, 769.

64. DUCOS S., BROUSSY J. et RUFFIE J. — Sang, 1959, **30**, 548.
65. EBERTH J.C. und SCHIMMELBUSCH C. — Arch. path. Anat., 1885, **101**, 201.
66. ENDRES G., KUBOWITZ F. — Biochem. Z., 1927, **191**, 395.
67. FANTL P., EBBELS L., NELSON J.F. — Brit. J. exp. Path., 1951, **32**, 538.
68. FEISSLY R. — C. R. 3<sup>e</sup> Congr. Soc. Europ. Hématol., Rome, 1951.
69. FEISSLY R., GAUTIER A., MARCOVICI J. — Schweiz. Med. Wschr., 1957, **87**, 1218.
70. FIESCH A. — 1<sup>er</sup> Symposium V. Baldacci, Madrid, 1955, p. 175.
71. FIRKIN B.G., WILLIAMS W.S. — J. clin. Invest., 1961, **40**, 423.
72. FLEISCHER G.A. — J. biol. Chem., 1954, **206**, 637.
73. FLEISCHER G.A. — Arch. Biochem., 1956, **61**, 119.
74. FONIO A. — Bull. schweiz. Akad. Med. Wiss., 1948, **4**, 470.
75. FRENDO J., KOJ A., ZGLICZYNSKI J.M. — Nature (Lond.), 1959, **189**, 685.
76. FUJITA A. — Klin. Wschr., 1928, **7**, 897.
77. GADDUM J.H. et GIARMAN J. — Brit. J. Pharmacol., 1956, **11**, 88.
78. GEPNER-WOZNIEWSKA M., CAEN J. — Rev. franç. Etud. clin. Biol., 1960, **V**, 375.
79. GLANZMANN E. — Jb. Kinderheik, 1918, **88**, 1.
80. GRIGNANI F., LOHR G.W. — Klin. Wschr., 1960, **38**, 796.
81. GROSS R. — Proc. 7<sup>e</sup> Congrès Soc. intern. Transf. Rome, Karger ed., 1958.
82. GROSS R., LOHR G.W., WALLER H.D. — Proc. 4th intern. Congress of Biochemistry Vienne 1958, New-York, Pergamon Press ed., 1959.
83. GROSS R., LOHR G.W., WALLER H.D. — 7<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hématol. London, 1959.
84. GROSS R., GEROK W., LOHR G.W., VOGELL W., WALLER H.D., THEOPOLD W. — Klin. Wschr., 1960, **38**, 193.
85. GROSS R. — Henry Ford Hospital intern. Sympos. Blood patelets. Detroit, March 1960, Boston, Mass., Little Brown and C<sup>o</sup> ed., 1961.
86. GROSS R. und HOLEMANS R. — Klin. Wschr., 1960, **19**, 999.
87. GROSS R. — 8<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hémat., Vienne 1961, p. 91. Abstracts. Wien, Druck R. Spies und C<sup>o</sup>.
88. HANAUSEK J. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1933, **114**, 817.
89. HARTMANN R.C. and CONLEY C.L. — Bull. Johns Hopk. Hosp., 1953, **93**, 355.
90. HERRIOT R.M., CONNOLLY J.T. et GRYTA S. — Nature (Lond.), 1961, **189**, 817.
91. HJORT P.F., PERMAN V., CRONKITE E.P. — Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1959, **102**, 31.
92. HJORT P.F. and PAPUTCHIS H. — Blood, 1960, **15**, 45.
93. HOFMAN-BERLING H. — Biochim. Biophys. Acta (Amst), 1956, **19**, 453.
94. HUGUES J. — Thrombos. diathes. haemorrh. (Stuttg.), 1959, **3**, 177.
95. IGLAUER K. und WEBER S. — Biochem. Z., 1931, **234**, 489.
96. JACKSON D.P., SORENSEN D.K., CRONKITE E.P., BOND V.P. and FLIEDNER T. — J. Clin. Invest, 1959, **38**, 1689.

97. JAMES L. and TULLIS M.D. — *Blood*, 1952, **7**, 891.
98. JAQUES L.B., FIDLAR E. and FELDSTED E.T. — *Canad. med. Ass. J.*, 1946, **55**, 26.
99. JAQUES L.B. — In the coagulation of blood: methods of study. Grune and Statton édit., 1955.
100. JEAN G. — *Experientia* (Basel), 1961, **17**, 428.
101. KOCHOLATY W. — *U.S. Army med. Res. Lab. Rep.*, 1960, **451**, 1.
102. KOPPEL J.L. and OLWIN J.H. — *Fred. Proc.*, 1954, **13**, 244.
103. KOPPEL J.L. and OLWIN J.H. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1954, **86**, 641.
104. KOPPEL J.L. and OLWIN J.H. — *Fred. Proc.*, 1956, **15**, 291.
105. LARRIEU M.J., CAEN J., LELONG J.C. et BERNARD J. — *Nouv. Rev. Franç. Hémat.*, 1961, **1**, 662.
106. LOEBER J. — *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, 1911, **140**, 281.
107. LOEWY R.G., DUNATHAN K. and GARDNER B. — *J. biol. Chem.*, 1961, **236**, 2644.
108. LOHR G.W. und WALLER H.D. — *Klin. Wschr.*, 1959, **16**, 833.
109. LOHR G.W. — 1<sup>er</sup> Sympo. Europ. Enzymologie Médicale, Milan 1960, Bâle, Karger édit., 1961.
110. LOHR G.W., WALLER H.D. und GROSS R. — *Dtsch. med. Wschr.*, 1961, **86-18**, 897 et **86-19**, 946.
111. LORIAN V. — *Press med.*, 1958, **66-46**, 1050.
112. LUSCHER E.F. — *Experientia* (Basel), 1956, **12**, 294.
113. LUSCHER E.F. — *Vox Sang* (Basel), 1956, **1**, 133.
114. LUSCHER E.F. — *Ergebn. Physiol.*, 1959, **50**, 1.
115. LUSCHER E.F. — *Schweiz. Med. Wschr.*, 1959, **89**, 1021.
116. LUSCHER E.F. — Henry Ford Hopital intern. Sympos. Blood Platelets, Detroit, March 1960, Boston. Little Brown and C<sup>o</sup>, 1961, p. 445.
117. MAGALINI S.I., STEFANINI M. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)*, 1956, **91**, 405.
118. MARMONT A. — *Actualita in Ematologia II*, Rome. Bruzzini édit., 1958.
119. MARKS P.A., GELLHORN A. and KIDSON C. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 2579.
120. MAUPIN B. et CHARY R. — *Sang*, 1952, **23**, 336.
121. MAUPIN B. — *Thèse Doct. Sci.*, Paris, 1958.
122. MAUPIN B. — *Rev. Hémat.*, 1953, **8**, 302.
123. MAUPIN B. — *Les plaquettes sanguines de l'homme*. Paris, Masson édit., 1954.
124. MAUPIN B. et LEROUX M. — *Biol. Médicale*, 1957, **46**, 473.
125. MAUPIN B., DAUSSET J. et BAUDOT Cl. — *Vox Sang.* (Basel), 1958, **3**, 178.
126. MAUPIN B. — *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1959, **IV**, 769.
127. MAUPIN B. — *Biol. Médicale*, 1960, **49**, 75.
128. MAUPIN B. — *Hémostase*, 1961, **1**, 29.
129. MAUPIN B., SAINT-BERNARD J. et STARCK J. — *Rev. franç. Etud. Clin. biol.*, 1962, **7**, 169.
130. MINOR A.H. and BURNETT L. — *Blood*, 1952, **7**, 693.
131. MIZUNO N.S., SAUTTER J.H. and SCHULTZE M.O. — *Proc. Soc. exp. Biol. Méd. (N.Y.)*, 1958, **98**, 42.

132. MONSO C. et ZUCKER M.B. — Ann. New-York Acad. Sci., 1958, **75**, 203.
133. MORITA H. and ASADA T. — Acta Haemat. jap., 1956, **91**, 426.
134. MORITA H. et ASADA T. — Sang., 1957, **28**, 827.
135. MORITA H. and YOSHIMURA H. — VII<sup>e</sup> Congrès Soc. intern. Hémat., Rome, 1958.
136. NELKEN D., GILBOA-GARBER N. and GUREVITCH J. — J. Clin. Path., 1960, **13**, 3, 266.
137. NIKOLAEVA N.I. — Byull. éksp. Biol. Méd., 1946, **22**, 24.
138. NOUR-ELDIN F. — Nature (Lond.), 1962, **196**, 1219.
139. ODELL T.T., TAUSCHE F.G. and GUDE W.D. — Amer. J. Physiol., 1955, **180**, 491.
140. OLLGARD E. — Acta haemat. (Basel), 1951, **6**, 220.
141. ONAKA M. — Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1911, **71**, 193.
142. PEDRAZZINI A. und SALVIDIO E. — Schweiz. Med. Wsch., 1956, **38**, 1097.
143. PIETTE M. et PIETTE C. — Sang., 1959, 30, 144.
144. PLAT P.M., BASTIDE P., SIMON E., JACQUEMET L. et DASTUGUE G. — Ann. Biol. clin., 1961, **19**, 745.
145. PLAT P.M. — Thèse Doct. Méd., Clermont-Ferrand, 1962.
146. PLAT P.M., BASTIDE P. et DASTUGUE G. — Nouv. franç. Hémat., 1963, **3**, 393.
147. RABINOVITCH M. and ANDREUCCI D. — Blood, 1949, **4**, 580.
148. RACCUGLIA G. and BETHELL F.H. — Amer. J. Clin. Path., 1960, **34**, 505.
149. RATTUNDE H.F. and KNUDSON A.G. — J. Lab. clin. med., 1959, **54**, 484.
150. ROGISTER G. et GEREBTZOFF M.A. — Acta anat. (Basel), 1958, **32**, 39.
151. RODMAN N.F., PAINTER J.C. et Mc DEVITT N.B. — J. Cell. Biol., 1963, **110**, 225.
152. ROSKAM J. — C. R. Soc. Biol (Paris), 1924, **91**, 373.
153. SALVIDIO E. et PARREIRA F. — IV<sup>e</sup> Cong. Soc. Europ. Hématologie, Amsterdam, 1953.
154. SALVIDIO E. — Prog. med. (Napoli), 1953, **9**, 562.
155. SARACINO R.T. — Sem. Hôp. Paris, 1951, **27**, 2615.
156. SCHAPIRA F. — Thèse Doct. Sci., Paris, 1959.
157. SCHAYER R.W. and KOBAYASHI Y. — Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.), 1956, **92**, 653.
158. SCHETTINI F., BERNI-CANANI M. und DI FRANCESCO L. — Pediatria, 1960, **4**, 656.
159. SCHETTINI F., DI FRANCESCO L. und BERNI-CANANI M. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1960, **36**, 1484.
160. SCHETTINI F., DI FRANCESCO L., BERNI-CANANI M. und REA F. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1961, **37**, 797.
161. SCHETTINI F., BERNI-CANANI M., REA F. und DI FRANCESCO L. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1961, **37**, 1016.
162. SCHMIDT E. und SCHMIDT F.W. — Klin Wschr., 1960, **38**, 957.
163. SCHRAM E. — Arch. int. Physiol., 1960, **68**, 698.
164. SEEGER W.H. — Sang., 1956, 27, 866.

165. SEEGER W.H. — Henry Ford Hospital Sympo. Blood Platelets, Detroit, March 1960, Boston. Little Brown and C<sup>o</sup> édit., 1961.
166. SMITH C., ROBINSON M. and TYSON R. — Anat. Rec., 1937, **70**, 139.
167. SOKAL G. — Bruxelles Arsacia et Paris, Maloine, 1960.
168. STEFANINI M. and DAMESHEK W. — The Hemorrhagic disorders, New-York. Grune et Stration, 1955.
169. STORTI C., PERUGINI S. und ROSSI V. — Medicina (Parma), 1953, **3**, 333.
170. SZIRMAI E. und BAJUSZ E. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 203.
171. TROPEANO L., NUNNARI A., CACCIOLA E., DI STEFANO S. und BELFIORE F. — Boll. Soc. ital. Biol. sper., 1958, **34**, 275.
172. TRUHAUT R. et CLANET F. — Rev. franç. Etud. clin. biol., 1962, **7**, 553.
173. TULLIS J.L. — Blood, 1952, **7**, 891.
174. TULLIS J.L. — Amer. J. med. Sci., 1953, **226**, 191.
175. VALETTE G., MAUPIN B. et HUIDOBRO H. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1951, **145**, 313.
176. VALETTE G., MAUPIN B. et HUIDOBRO H. — Path. et Biol., 1957, **5**, 2165.
177. VINCENT D., MAUPIN B. et MARQUES VINCENT M.C. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1962, **156**, 283.
178. VOGELL W., BISHAI Fr., BUCHER T., KLINGENBERG M. and PETTE D. — Biochem. Z., 1959, **332**, 81.
179. WAGNER R. — Arch. Biochem., 1946, **11**, 249.
180. WAGNER R. et YOURKE A. — Arch. Biochem., 1955, **54**, 174.
181. WALLER H.D., LOHR G.W., KARGES O. und GROSS R. — VI<sup>e</sup> Congrès Soc. Int. Hémat., Rome, 1958, p. 255.
182. WALLER H.D., LOHR G.W., KARGES O. und GROSS R. — Proc. 7<sup>e</sup> Congress Inter. Soc. Hemat. Scientifico, Rome, 1958, p. 796.
183. WALLER H.D., LOHR G.W., GRIGRANI F. und GROSS R. — Thrombos. diathes. haemorrh. (Stuttg.), 1959, **3**, 520.
184. WARBURG O. — Munch. med. Wschr., 1911, **58**, 289.
185. WARE A.G. and SEEGER W.H. — J. Biol. Chem., 1948, **172**, 690.
186. WEISTEIN H.G., SCHAFFNER G. and HELLER P. — Clin. Res., 1959, **7**, 211.
187. WEISSBACH H. and REDFIELD B.G. — In « Blood Patelets », Boston. Little Brown and C<sup>o</sup> éd., 1961, 393.
188. WURZEL H., MECREARY T., BAKER L. and GUMERMAN L. — Blood, 1961, **17**, 314.
189. ZAJICEK J. and DATTA N. — Acta Haemat. (Basel), 1953, **9**, 115.
190. ZAJICEK J., SYLVEN B. and DATTA N. — J. Histochem. Cytochem., 1954, **2**, 115.
191. ZAJICEK J. — Acta Haemat. (Basel), 1956, **15**, 296.
192. ZUCKER M.B. and BORELLI J. — J. Appl. physiol., 1955, **7**, 425.
193. ZUCKER M.B. and BORELLI J. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 203.
194. ZUCKER M.B. and BORELLI J. — J. appl. Physiol., 1958, **12**, 453.
195. ZUCKER M.B. — Proger. Hemat., 1959, **2**, 206.
196. ZUCKER M.B. and BORELLI J. — J. clin. Invest., 1959, **38**, 148.
197. ZUCKER M.B. and BORELLI J. — J. appl. Physiol., 1959, **14**, 575.

## TABLE DES MATIERES

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Introduction .....                                                         | 11 |
| Chapitre I : Conditions d'obtention des préparations<br>enzymatiques ..... | 13 |
| Chapitre II : Enzymes et plaquettes .....                                  | 21 |
| Chapitre III : Enzymes et métabolisme .....                                | 37 |
| Chapitre IV : Enzymes et fonctions .....                                   | 45 |
| Chapitre V : Enzymes plaquettaires dans la maladie<br>de Glanzmann .....   | 51 |
| Conclusion .....                                                           | 55 |
| Bibliographie .....                                                        | 57 |

---





